

RNA ヘリカーゼ YTHDC2 の転写制御機構と
癌転移における YTHDC2 の役割についての解析

The study of the transcriptional machinery of
RNA helicase YTHDC2 and the role of YTHDC2
in tumor metastasis

2016 年 2 月

麻布大学大学院 獣医学研究科

動物応用科学専攻 博士後期課程

基礎生命科学

DA1301 田辺 敦

目次

要旨	2
英文要旨	3
緒言	4
第1章 YTHDC2 の転写制御機構の解析	
1-1. 序論	7
1-2. 材料と方法	7
1-3. 結果	23
1-4. 考察	29
第2章 YTHDC2 の癌転移促進効果の解析	
2-1. 序論	31
2-2. 材料と方法	31
2-3. 結果	37
2-4. 考察	45
第3章 YTHDC2 による HIF-1 α の翻訳促進機構の解析	
3-1. 序論	47
3-2. 材料と方法	47
3-3. 結果	52
3-4. 考察	56
総括	58
引用文献	60
謝辞	65

要旨

YTH domain containing 2(YTHDC2)はDEXD/H box ファミリーに属する RNA ヘリカーゼである。以前に筆者らは、YTHDC2 が様々なヒトの癌種で過剰発現していることを発見した。本研究では、YTHDC2 の転写制御機構と癌細胞の主要な悪性形質の一つである癌転移における YTHDC2 の役割について解析した。ルシフェラーゼレポーターアッセイおよびクロマチン免疫沈降法で転写制御機構を調べた結果、*YTHDC2* 遺伝子のプロモーターに存在する転写因子結合サイト cAMP Response Element(CRE)と転写因子 c-Jun, ATF2 の活性化が転写制御に重要であることが明らかになった。続いて、癌転移における YTHDC2 の役割を解析するため、shRNA を用いて YTHDC2 の内在性の発現を抑制したヒト大腸癌細胞を樹立した。wound healing および Transwell アッセイによって、YTHDC2 の発現抑制が大腸癌細胞の *in vitro* における運動能力を有意に低下させることが示された。また、低下した細胞の運動能力は YTHDC2 を再発現させることで回復した。さらに、YTHDC2 の発現抑制は *in vivo* における大腸癌細胞の転移能力も低下させることが異種移植マウスモデルの実験から示唆された。続いて、ヒト大腸癌患者 72 例の病理組織標本における YTHDC2 の発現を免疫組織化学染色で調べた結果、YTHDC2 の発現と癌の進行度の間に有意な正の相関が認められ、臨床的にも YTHDC2 が転移を伴う大腸癌の進行に重要な役割を持つことが示唆された。次に、低酸素環境における YTHDC2 の機能を調べた結果、低酸素誘導因子 1 α (HIF-1 α)の翻訳を促進していることがわかった。低酸素環境において HIF-1 α は癌細胞の上皮間葉系転換に関わる遺伝子群の転写に必要とされる。これらの結果から、RNA ヘリカーゼ YTHDC2 が HIF-1 α の翻訳を促進することで大腸癌細胞の転移に寄与すること、そして YTHDC2 が癌治療の予後予測因子や治療標的遺伝子になり得ることが示唆された。

英文要旨

YTH domain containing 2 (YTHDC2) belongs to the DExD/H-box family of ATP-dependent RNA helicases. The author previously found that YTHDC2 expression is up-regulated in several human cancer cells. In this study, the author investigated the transcriptional machinery of YTHDC2 and the role of YTHDC2 in tumor metastasis. By luciferase reporter assay and chromatin immunoprecipitation assay, it was identified that the cAMP response element (CRE) in the promoter region of *YTHDC2* gene and activation of transcription factor c-Jun and ATF-2 could be critical for transcription of YTHDC2. To investigate the role of YTHDC2 on tumor metastasis, the author established YTHDC2 knocked-down colon tumor cell lines by shRNA strategy. The repression of YTHDC2 significantly decreased *in vitro* motility of colon tumor cells in wound healing and transwell assay. In addition, decreased cell motility was restored by re-expression of YTHDC2. Furthermore, the repression of YTHDC2 also inhibited *in vivo* metastatic ability of colon tumor cells in a xenograft mouse model. Subsequently, the author examined expression levels of YTHDC2 by immunohistochemical staining in human colon cancer tissues from 72 patients and found a significantly positive correlation between YTHDC2 expression and the tumor stage. These data indicated that YTHDC2 plays important roles in clinical progression of colon tumors, including metastasis. Next, the author investigated the function of YTHDC2 in hypoxia and found that YTHDC2 promotes translation of HIF-1 α . HIF-1 α is required for transcription of epithelial-to-mesenchymal transition-related genes. In conclusion, these results suggest that the RNA helicase YTHDC2 contributes to colon tumor metastasis by promoting translation of HIF-1 α and that YTHDC2 is potentially a diagnostic marker and target gene for cancer therapies.

緒言

本研究は、種々のヒト癌細胞において発現が亢進している YTH domain containing 2(YTHDC2)を対象にしている。

1. DExD/H box RNA ヘリカーゼについて

YTHDC2 は DExD/H box RNA ヘリカーゼファミリーに属している。YTHDC2 はヘリカーゼドメインとは別に、YTH ドメインと呼ばれる RNA との結合能力がある部位を C 末端側に含んでおり、それが遺伝子名の由来になっている^(1, 2)。DExD/H box RNA ヘリカーゼは特徴的な 8 つのモチーフによって構成される 2 つのヘリカーゼドメインを持っている^(3, 4)。アミノ末端ドメインには、ATP 結合モチーフ I, II、ATP 加水分解モチーフ III、そして RNA 結合モチーフ Ia, Ib が含まれている。カルボキシル末端ドメインには、RNA 結合モチーフ IV, V と ATP 結合モチーフ VI が含まれている。DExD/H box(アスパラギン酸-グルタミン酸-X-アスパラギン酸/ヒスチジンが並んだ部分)は ATP 結合モチーフ II に含まれている。DExD/H box ファミリーに属する RNA ヘリカーゼは、転写、スプライシング、翻訳などの様々な RNA の代謝機構に関わっている^(5, 6)。特に翻訳開始において、mRNA の非翻訳領域の二次構造を解くことが RNA ヘリカーゼの重要な役割の一つだと考えられている⁽⁷⁾。最近の研究で、DDX3 や DHX29 などの RNA ヘリカーゼが癌で過剰発現し、様々な遺伝子の翻訳開始を促進することで癌の進行に寄与していることが報告されている^(8, 9)。

2. YTH domain containing 2(YTHDC2)について

以前に当研究室は YTHDC2 が宿主因子のシクロフィリン B(CyPB)と C 型肝炎ウイルス(HCV)由来 RNA ポリメラーゼ : NS5B と三量体を形成することで HCV

ゲノムの複製に寄与することを報告してきた⁽¹⁰⁾。さらに、当研究室は種々のヒト由来の癌細胞において YTHDC2 の発現が亢進していることや炎症性サイトカイン TNF α によって刺激されることで正常な肝細胞でも YTHDC2 の発現が誘導されることを発見している⁽¹⁰⁾。これらの背景と RNA ヘリカーゼの特徴から、YTHDC2 は正常細胞の炎症に伴う癌化の過程や癌の進行に必要とされる様々なタンパク分子の翻訳において重要な役割を果たしていることが示唆された。

3. 癌転移と細胞の上皮間葉転換について

転移は癌による死亡原因の大部分を占める悪性形質である。転移は一般的に、原発腫瘍から浸潤した癌細胞が細胞外基質を通り抜け、血管内に侵入し、血流によって目的の臓器まで運ばれ、毛細血管から臓器内へ侵入し、そこで転移巣を形成するという過程を経て成立する^(11, 12)。原発腫瘍から分離し、組織外へ浸潤するために、上皮系の癌細胞は自身を間葉系の形質に変化させる。これを癌細胞の上皮間葉転換(Epithelial-Mesenchymal Transition, EMT)と呼ぶ^(11, 12)。EMTにより周囲の細胞との接着性を失うことで、癌細胞は浸潤・転移能力を獲得できるようになる。EMTは複雑なメカニズムによって制御されているが、細胞接着分子である E カドヘリンの発現の抑制が最も重要な要素の一つである。EMTに関わる多くの転写因子群(Snail, ZEB, Twist など)が、E カドヘリンの発現を抑制することが知られている^(11, 12)。細胞外からの様々なシグナル伝達分子(TGF- β , FGF, EGF, Wnt など)がこれらの転写因子群を活性化する^(11, 12)。また、腫瘍は低酸素、低栄養、小胞体ストレスなどといった多くのストレス刺激を受けており、それらが癌細胞の EMT を誘導することが報告されている。例えば、癌細胞が低酸素に曝されると、転写因子である低酸素誘導因子(Hypoxia Inducible Factor, HIF)が安定化し、EMT や血管新生を誘導する^(13, 14)。最近の研究で、一部の RNA

ヘリカーゼが翻訳依存的な機序で癌細胞の転移を促進していることが報告されている⁽¹⁵⁾。

4. 本研究の目的

本研究で筆者は、YTHDC2 の転写制御機構と癌転移における YTHDC2 の役割について解析を行った。本研究の第 1 章では、筆者らはヒト肝癌細胞とヒト正常肝細胞を用いて *YTHDC2* 遺伝子のプロモーター領域とそこに結合する転写因子について調べた。続く第 2 章では、癌の転移を伴う進行に YTHDC2 がどのような役割を果たしているか解析するため、shRNA を用いて YTHDC2 の発現を抑制したヒト大腸癌細胞株を樹立し、その細胞株の運動能力や転移能力を *in vitro* および *in vivo* の手法で解析した。さらに、ヒト大腸癌の進行度と YTHDC2 の発現に相関があるか否かを大腸癌患者 72 例由来の病理組織標本を用いて、外科病理学的に評価した。第 3 章では、低酸素環境における YTHDC2 の機能を解析し、YTHDC2 の翻訳標的遺伝子として低酸素誘導因子 1 α (HIF-1 α)を新たに同定した。

第 1 章 YTHDC2 遺伝子の転写制御機構の解析

1-1. 序論

YTHDC2 は肝癌をはじめとした癌細胞では発現が亢進しているが、一方で正常組織では発現が抑制されていることがわかっている⁽¹⁰⁾。しかし、YTHDC2 の転写制御機構についてはまだほとんど解明されていない。

そこで、本章における実験ではヒト正常肝細胞とヒト肝癌細胞における詳細な YTHDC2 の転写制御機構を解析するために、YTHDC2 遺伝子上流にあるプロモーター領域およびそこに結合する転写因子の同定をルシフェラーゼレポーターアッセイ法やクロマチン免疫沈降法(ChIP)などによって行った。

1-2. 材料と方法

1-2-1. 細胞培養

ヒト肝癌由来細胞株 Huh-7 細胞は京都大学ウイルス研究所下遠野忠邦教授(現千葉工業大学)より供与された。ヒト正常肝細胞は大日本住友製薬株式会社から購入した。Huh-7 細胞およびヒト正常肝細胞は Dulbecco's modified Eagle medium (Sigma-Aldrich, MO, USA)に 10% ウシ胎児血清(FBS : Biowest, Saskatoon, Canada)、2 mM glutamine、100 U/ml penicillin、100 µg/ml streptomycin、Non Essential Amino Acid (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA)を添加したものを基本培地とし、37°C 5% CO₂ のインキュベーターで培養した。

1-2-2. ルシフェラーゼ発現ベクターの作製

YTHDC2 遺伝子を含む BAC クローン(RP11-64F17)を Children's Hospital Oakland Research Institute から購入した。この BAC クローンをテンプレートに、

LA-Taq DNA polymerase(TaKaRa, Kyoto, Japan)を使用した PCR により YTHDC2 の転写開始点より-4090 から+159 塩基、-1317 から+159 塩基、-724 から+159 塩基、-724 から-262 塩基、そして-261 から+159 塩基までのプロモーター領域を増幅した。使用したプライマーは表 1-1 に示す。この PCR 産物を TOPO TA Cloning Kit(Thermo Fisher Scientific)により pCRII-TOPO ベクター(Thermo Fisher Scientific)に組んだ。そのベクターから制限酵素 Sac I および Hind III でプロモーター領域を切り出し、同じ制限酵素で処理したホタルルシフェラーゼ発現ベクター ; pGL4.10-luc ベクター(Promega, WI, USA)に組み込んだ。

1-2-3. PCR

PCR は LA-Taq DNA polymerase System または Go Taq Flexi DNA Polymerase System(Promega)で行った。プライマーの塩基配列を表 1-1 に示した。表 1-2, 3 があるような反応液を作製し、表 1-2, 3 に示した温度条件で PCR を行った。PCR 産物は全量を 1%アガロースゲルで電気泳動し、目的のバンドを切り出し、Gel Extraction Kit(QIAGEN Inc, CA, USA)で PCR 産物を抽出した。抽出した PCR 産物は吸光光度計で定量した。

表 1-1. 第 1 章で使したプライマーの塩基配列

Set number	Name	Sequence (5' → 3')
1	-4090/+159	F: ttgagctcGTCCCAGGAGACAACTCCAT R: ttaagcttGCTAGCTGACAGCCAATGAC
2	-1317/+159	F: ttgagctcCTAGCCTAAGCTTCTTTACT R: ttaagcttGCTAGCTGACAGCCAATGAC
3	-724/+159	F: ttgagctcAATATTCCGCCCCCTTCTTA R: ttaagcttGCTAGCTGACAGCCAATGAC
4	-724/-262	F: ttgagctcAATATTCCGCCCCCTTCTTA R: ttaagcttAGGTTCTTACCTTCATGGAGTT
5	-261/+159	F: ttgagctcTGGCTCTCTGGTTCTCCAAT R: ttaagcttGCTAGCTGACAGCCAATGAC
6	M-CRE	F: CGCCGGCCCTGGTGACGTCATTACGCCCGC F: GCGGGCGTAATGACCACACCAGGGCCGGCG
7	M-GATA	F: CTCGCCTGGCCGTGATATCAATGGCGCAGG R: CCTGCGCCATTGATACAACGGCCAGGCGAG
8	M-AP-1	F: ACTTCTGCTGTGGCGGTGACTGAGGCCTTTCTGGTGA R: TCACCAGAAAGGCCTCAACTACCGCCACAGCAGAAGT
9	G6PDH	F: CTGCGTTATCCTCACCTTC R: CGGACGTCATCTGAGTTG
10	YTHDC2	F: GTGTCTGGACCCCATCCTTA R: CCCATCACTTCGTGCTTTTT
11	-80/+74	F: GCAGACAGCCTCCTTTAGGC R: CACCAGAAAGGCCTCAGTCA
12	β -actin	F: CACCAACTGGGACGACAT R: ACAGCCTGGATAGCAACG
13	HIF-1 α	F: CTGTCGCTTTGAGTCAAAGA R: GCATCCTTTTACACGTTTCC
14	HIF1 α 5'UTR	F: ttaagcttGCGCGCGCCGGCCTGGGC R: ttccatggGGTGAATCGGTCCCCGCGAT

F: Forward primer

R: Reverse primer

Lowercase letters indicate the restriction site

ttgagctc: Sac I site

ttaagctt: HindIII site

ttccatgg: NcoI site

表 1-2. TaKaRa La-Taq DNA polymerase System

反応液

	容量 (μl)
LaTaq PCR Buffer	10
MgCl ₂ (25 mM)	6
dNTP(10 mM)	2
Primer F (10 μM)	1
Primer R (10 μM)	1
LaTaq Polymerase(5 u/μl)	0.5
H ₂ O	28.5
Template	1
Total	50

温度条件

Step	Temperature	Time	Number of Cycles
Initial Denaturation	96°C	5 min	1 cycle
Denaturation	96°C	30 sec	30 cycles
Annealing	55°C	30 sec	
Extension	72°C	7 min	
Final Extension	72°C	10 min	1 cycle
Soak	10°C	∞	1 cycle

表 1-3. Go Taq Flexi DNA Polymerase System

反応液

	容量 (μl)
GoTaq Flexi Buffer	10
MgCl ₂ (25 mM)	4
dNTP(10 mM)	2
Primer F (10 μM)	1
Primer R (10 μM)	1
GoTaq Polymerase(5 u/μl)	0.5
H ₂ O	30.5
Template	1
Total	50

温度条件

Step	Temperature	Time	Number of Cycles
Initial Denaturation	95°C	5 min	1 cycle
Denaturation	95°C	30 sec	30 cycles
Annealing	55°C	30 sec	
Extension	72°C	1 min	
Final Extension	72°C	10 min	1 cycle
Soak	10°C	∞	1 cycle

1-2-4. ライゲーション反応

pCRII-TOPO ベクターまたは pCR4-TOPO ベクターを使用したライゲーション反応は、TOPO TA Cloning Kit を使用した。表 1-4 に示す反応液を作製し、室温で 5 分間インキュベートしてライゲーション反応を行った。pGL4.10-Luc ベクターを使用したライゲーション反応は、T4 DNA Ligase(Thermo Fisher Scientific) のシステムを使用した。表 1-5 に示す反応液を作製し、4°Cで一晩インキュベートしてライゲーション反応を行った。pGEM-T easy ベクターを使用したライゲ

ーション反応は pGEM-T easy vector Systems を使用した。表 1-6 に示す反応液を作製し、4℃で一晩インキュベートしてライゲーション反応を行った。

表 1-4. TOPO TA Cloning Kit のライゲーション反応液

	容量(μl)
Dilute Salt Solution	1
Insert DNA	1
pCR-TOPO II/pCR4-TOPO vector	1
H ₂ O	3
Total	6 μl

表 1-5. T4 DNA Ligase を使ったライゲーション反応液

	容量(μl)
5×T4 Ligase Buffer	4
T4 Ligase (1 Unit/μl)	1
Insert DNA	0.5
pGL4.10-Luc vector	0.5
H ₂ O	14
Total	20 μl

表 1-6. pGEM-T easy vector Systems を使ったライゲーション反応液

	容量(μl)
2×Rapid Ligation Buffer	2.5
Insert DNA	1.5
pGEM T easy vector	0.5
T4 DNA Ligase(3 Weiss units/μl)	0.5
Total	5 μl

1-2-5. 大腸菌の形質転換

インサート DNA を組み込んだ pCR-TOPO II ベクターと pGL4.10-Luc ベクター

で大腸菌コンピテントセル DH5 α (TOYOBO, Osaka, Japan)を形質転換した。インサート DNA を組み込んだ pCR4-TOPO ベクターで大腸菌コンピテントセル TOP10(Thermo Fisher Scientific)で形質転換した。形質転換した大腸菌を LB 寒天培地で 16 時間培養したのち、出現したコロニーを LB 液体培地で培養し、ミニプレパレーション(QIAGEN)によって大腸菌からプラスミドベクターを抽出、精製した。

1-2-6. 転写因子結合サイトへの変異導入

転写因子結合サイトに変異を導入するために QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies, CA, USA)を使用した。表 1 に示すプライマーを用いて、Kit の説明書に従い実験を行った。転写因子結合サイトの変異箇所は表 1-7 に示す。

表 1-7. 転写因子結合サイトの変異箇所

転写因子結合サイト	変異箇所
W-CRE	TG <u>A</u> CGTCA
M-CRE	TGT <u>T</u> GGTCA
W-GATA	CGT <u>G</u> ATATCA
M-GATA	CGT <u>T</u> GTATCA
W-AP-1	TG <u>A</u> CTGA
M-AP-1	TAT <u>T</u> GTGA

W: wild type/M: mutant

1-2-7. プロモーター活性測定のためのルシフェラーゼレポーターアッセイ

ルシフェラーゼレポーターアッセイに際し、処理前日に Huh-7 細胞を 5×10^3 cells/well の濃度で 24 well plate(BD Falcon, CA, USA)に基本培地を用いて培養した。翌日、基本培地を交換し、37°C で 30 分間インキュベートした。その間に、

2.3 $\mu\text{l/well}$ リポフェクタミン 2000(Thermo Fisher Scientific)を 54 $\mu\text{l/well}$ Opti-MEM に混和し 5 分間静置した。その溶液に *YTHDC2* 遺伝子のプロモーター領域を組み込んだ pGL4.10-Luc ベクター(1 μg)とインターナルコントロールとしてウミシイタケルシフェラーゼ発現ベクターである pGL4.74-Luc ベクター(40 ng)を加え、さらに 20 分間静置した。20 分後、その混和溶液を well に添加し、24 時間培養した。24 時間後、細胞を回収し、ホタルルシフェラーゼとウミシイタケルシフェラーゼの活性を Dual-Luciferase Reporter Assay System(Promega)を用いて測定し、比率を求めた。比率=ホタルルシフェラーゼ活性／ウミシイタケルシフェラーゼとして、その値から pGL4.10-Luc ベクターに組み込んだプロモーターの活性を定量した。

1-2-8. Total RNA 回収と逆転写反応

細胞からの Total RNA 回収は RNeasy Mini Kit(QIAGEN)を用いて行った。回収された Total RNA は吸光光度計で定量した。Total RNA からの逆転写反応は Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit(Roche Applied Science, Penzberg, Germany)を使用した。はじめに 500 ng Total RNA と 600 μM ランダムプライマーを 1 μl を混合し、総量 13 μl になるように水を加えた。その溶液をサーマルサイクラーで 65°C、10 分間処理し、10 分後ただちに氷中で 5 分間冷却した。冷却後、4 μl の Transcriptor RT Reaction Buffer(250 mM Tris/HCl, 150 mM KCl, 40 mM MgCl_2)、50 μM RNase Inhibitor を 0.25 μl 、100 μM dNTPmix を 1 μl そして 20 u/ μl Transcriptor を 0.25 μl を混合し、総量 20 μl になるように水を加えた。サンプルを 25°C 10 分間、50°C 1 時間、85°C 5 分間の順番でサーマルサイクラーを用いて処理して反応させ、single strand cDNA(ssDNA)ライブラリーを作製した。

1-2-9. 定量的 real-time PCR

定量的 real-time PCR のために用いたプライマー(Sigma-Aldrich)は表 1-1 に示した。定量的 real-time PCR による増幅を定量化するために、表 1-1 で示したプライマーによって増幅される各々の標的遺伝子の断片をベクターに組み込んだ遺伝子標準プラスミドを作製した。*G6PDH*、*YTHDC2* の遺伝子断片のクローニングには、それぞれ HUVEC 細胞由来(*G6PDH*)、MH14 細胞由来(*YTHDC2*)の ssDNA ライブラリーをテンプレートとして用い、Go Taq Flexi DNA Polymerase System を用いて PCR を行った。各遺伝子とも PCR は表 1-3 に示す反応液を作製し、表 1-4 に示す温度条件で行った。*G6PDH* と *YTHDC2* の PCR 産物を 1%アガロースゲルで電気泳動し、ゲルから Gel Extraction Kit で PCR 産物を抽出した。それらの遺伝子断片を組み込んだ pCR4-TOPO ベクターで大腸菌コンピテントセル TOP10 を形質転換した。形質転換した大腸菌から精製されたプラスミド DNA に目的の遺伝子断片が組み込まれているかを調べるために、そのプラスミドをテンプレートにし、先と同じ条件で PCR を行った。目的の遺伝子断片が導入されたプラスミド濃度は吸光光度計で測定された。表 1-8 に示した計算式によってプラスミド DNA 濃度からコピー数を算出した。遺伝子標準プラスミドの定量的 real-time PCR による標準増幅曲線を作製するために、そのプラスミド DNA を 2×10^9 、 2×10^8 、 2×10^7 、 2×10^6 、 2×10^5 、 2×10^4 、 2×10^3 copy/ μ l の濃度に段階希釈し、PCR のテンプレートとした。定量的 real-Time PCR は LightCyclerFastStart DNA Master^{plus}SYBR Green I system (Roche Applied Science)を用い、表 1-9 に示す反応液を調製し、表 1-9 に示す温度条件で Roche 社 Light Cycler で行った。各濃度のプラスミド DNA から得られた Ct 値(一定の蛍光強度になるサイクル数)から検量線を計算し、LightCycler のソフトウェア(LightCycler Software 3.5.3, Roche Applied Science)に登録した。遺伝子発現を調べたいサンプルについても同条件下で定量

的 real-time PCR を行い、Ct 値を求めれば、登録された検量線より、そのサンプル中の標的遺伝子の発現量を求めることができる。

表 1-8. DNA 濃度からコピー数を算出するための計算式

$$\frac{X \times 9.12 \times 10^{11}}{(\text{vectorの塩基数} + \text{insert DNAの塩基数})} = Y \text{ (copy/}\mu\text{l)}$$

X: サンプルの DNA 濃度(ng/μl)

Y: サンプル 1 μl 当たりのプラスミド DNA のコピー数

表 1-9. 定量的 real-time PCR 反応条件

反応液

	容量 (μl)
Reaction Mix SYBR GREEN I	2
Primer F (10 μM)	1
Primer R (10 μM)	1
H ₂ O	15
Template	1
Total	20

温度条件

Step	Temperature	Time	Number of Cycles
Denaturation	95°C	10 min	1 cycle
Amplification	95°C	10 sec	45 cycle
	60°C	10 sec	
	72°C	10 sec	
Melting Curve	95°C	0 sec	1 cycle
	65°C	15 sec	
	95°C	0 sec	
Cooling	40°C	30 sec	1 cycle

1-2-10. ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)とウエスタンブロット法

回収された細胞は 1×10^7 cells/ml になるように Lysis Buffer(表 1-10)を加えて、溶解し、氷上で 30 分間静置した。サンプル量の 1/2 量の Sample Buffer(表 1-11)を加え、100℃で 5 分間インキュベートし、サンプルとした。SDS-PAGE に用いたゲルは表 1-12 および表 1-13 に示す組成のものを使用し、Running Buffer(表 1-14)が入った泳動槽で 150V、1 時間泳動した。電気泳動後、Transfer Buffer(表 1-15)が入った Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell(Bio-Rad, CA, USA)で 0.1A、4 時間の条件で通電し、ゲル中のタンパク質を PVDF メンブレン(Merck Millipore, Darmstadt, Germany)にブロットした。その後、メンブレンを回収し、5%スキムミルク PBS に浸し、Blocking を行った。各転写因子の検出には、一次抗体として、200 倍した抗 CREB 抗体(Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)、抗 P-CREB 抗体(Santa Cruz Biotechnology)、抗 ATF-2 抗体(Santa Cruz Biotechnology)、抗 P-ATF-2 抗体(Santa Cruz Biotechnology)、抗 c-Jun 抗体(Active Motif, CA, USA)、抗 P-c-Jun(Santa Cruz Biotechnology)抗体を使用した。β-actin の検出には、一次抗体として、5000 倍希釈した抗 β-actin 抗体(Sigma-Aldrich)をメンブレンに添加し、室温で 45 分間処理した。その後、Wash Buffer(PBS-0.1% Tween 20)で 2 度洗浄した。p-ATF-2、P-c-Jun、β-actin の検出には二次抗体として Peroxidase を標識した抗 Mouse IgG 抗体(Kirkegaard & Perry Laboratories, MD, USA)、P-CREB は抗 Goat IgG 抗体(Kirkegaard & Perry Laboratories)、c-Jun と CREB は抗 Rabbit 抗体(Kirkegaard & Perry Laboratories,)をそれぞれ 2000 倍希釈して用いた。一次抗体のときと同様に室温で 45 分間処理して、Wash Buffer で 2 度洗浄した。メンブレンを洗浄後、ECL Western Blotting Detection System(GE Healthcare UK Ltd, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK)を用い、自動現像機 TCX-101(Konica Minolta, Tokyo, Japan)で現像した。

表 1-10. Lysis Buffer の組成

	最終濃度
Tris-HCl(pH 8.0)	50 mM
NaCl	150 mM
EDTA	1.0 mM
NP-40	0.5%
Complete Protease Inhibitor Cocktail	1 tablet

表 1-11. Sample Buffer の組成

	最終濃度
Tris-HCl(pH 8.0)	0.2 mM
2-Mercaptoethanol	15%
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	6%
Sucrose	15%
Bromophenol Blue	0.01%

表 1-12. SDS-PAGE における 10%分離ゲルの組成

	容量(μl)
H ₂ O	2237
Protogel *1	1833
Buffer(pH 8.8) *2	1375
10% Ammonium persulfate	55
N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine	3.3

*1 Protogel : 30% Acrylamide, 0.8% Bis-Acrylamide

*2 Buffer(pH 8.8) : 1.5 M Tris-HCl pH 8.8, 0.4% SDS

表 1-13. SDS-PAGE における濃縮ゲルの組成

	容量(μl)
H ₂ O	1280
Protogel *1	200
Buffer(pH 6.8) *2	500
10% Ammonium persulfate	20
N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine	3.3

*1 Protogel : 30% Acrylamide, 0.8% Bis-Acrylamide

*2 Buffer(pH 6.8) : 0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 0.4% SDS

表 1-14. SDS-PAGE における Running Buffer の組成

	容量(g/l)
Tris-base	3.03
Glycine	14.4
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	1

表 1-15. SDS-PAGE における Transfer Buffer の組成

	容量(g/l)
Tris-base	3.03
Glycine	14.4

1-2-11. クロマチン免疫沈降実験(ChIP)

クロマチン免疫沈降実験(ChIP)は ChIP-IT Express Enzymatic Kit(Active Motif)を用いて行なった。Huh-7 細胞を 10 cm dish(BD Falcon)に 1×10^6 cells/dish の濃度で基本培地を用いて培養した。翌日、Kit の説明に従い ChIP を行なった。細胞に 1%ホルムアルデヒドを処理し、転写因子と DNA との結合を固定した。細胞をセルスクレーパー(BD Falcon)ではがし、Kit に付属している Lysis Buffer を 1ml 加え懸濁したのち 30 分間氷上で反応させた。30 分後、細胞懸濁液を氷冷した Dounce 型ホモジナイザーに移し、氷上でペッスルを 10 往復させることにより、細胞を破碎した。その後、細胞質分画とクロマチンを含む核分画に遠心分離した。核分画に制限酵素を加え、37℃で 15 分間反応させることで、クロマチンに含まれる DNA を適切な長さに断片化した。抗 P-c-Jun 抗体、抗 P-ATF-2 抗体、抗 P-CREB 抗体、抗 RNA polymerase II 抗体(Active motif)により、4℃、4 時間、ローターで攪拌しながら免疫沈降を行なった。実験のネガティブコントロールとして抗 Rabbit IgG 抗体による免疫沈降を行なった。免疫沈降後、転写因子に結合しているゲノム DNA を精製した。サンプル中に含まれる *YTHDC2* 遺伝子のプロモーター領域の DNA を定量するために、定量的 real-time PCR を用いた。ま

ず、定量的 real-time PCR による増幅を定量化するため、標準プラスミドを作製した。Huh-7 由来のゲノム DNA をテンプレートにして、表 1-1 に示すプライマーを用い、表 1-3 に示す条件で PCR を行った。これによって増幅されるのは、*YTHDC2* 遺伝子のプロモーター領域の CRE サイトを含む 154 塩基の PCR 産物である。増幅された PCR 産物を pGEM T easy ベクターに組み込んだ。表 1-5 に示す反応液を作製し、4℃で一晩インキュベートしてライゲーション反応を行った。ライゲーションしたプラスミドベクターで大腸菌コンピテントセル DH5α を形質転換し、LB 寒天培地で培養した。16 時間の培養後、出現したコロニーを LB 液体培地で培養し、ミニプレパレーションによってプラスミド DNA を大腸菌から抽出、精製した。標準増幅曲線の作製は、材料と方法 1-2-8 で述べた方法と同様に行った。定量的 real-time PCR は表 1-16 に示す反応液を調製し、表 1-16 に示す温度条件で行った。各転写因子の抗体で免疫沈降した ChIP サンプルと免疫沈降を行っていない Input DNA 中に含まれる *YTHDC2* 遺伝子のプロモーター領域の DNA 量を測定し、比率を求めた。比率=(ChIP サンプル中の *YTHDC2* 遺伝子のプロモーター領域の DNA 量)/(Input DNA 中の *YTHDC2* 遺伝子のプロモーター領域の DNA 量)として、その値から各転写因子が *YTHDC2* 遺伝子のプロモーターへ結合しているか否かを解析した。

表 1-16. ChIP サンプルの定量的 real-time PCR 反応条件

反応液

	容量 (μl)
Reaction Mix SYBR GREEN I	2
Primer F (10 μM)	1
Primer R (10 μM)	1
H ₂ O	11
Template	5
Total	20

温度条件

Step	Temperature	Time	Number of Cycles
Denaturation	95°C	10 min	1 cycle
Amplification	95°C	10 sec	45 cycle
	55°C	10 sec	
	72°C	10 sec	
Melting Curve	95°C	0 sec	1 cycle
	65°C	15 sec	
	95°C	0 sec	
Cooling	40°C	30 sec	1 cycle

1-2-12. ヒト正常肝細胞に対するサイトカイン処理

炎症性サイトカイン TNFα 処理に際し、処理前日にヒト正常肝細胞を 100 mm dish (BD Falcon) に 2×10^6 cells/dish の濃度で基本培地にて培養した。翌日、基本培地を交換した後、TNFα を 100 pg/ml になるように添加し、1、3、6、9、12、24 時間後にそれぞれの細胞を回収した。ChIP 実験に際しては、前日にヒト正常肝細胞を 100 mm dish (BD Falcon) に 1×10^6 cells/dish の濃度で基本培地にて培養した。翌日、基本培地を交換した後、TNFα を 100 pg/ml になるように添加した。

TNF α 処理から 6 時間後、材料と方法 1-2-10 と同様の方法で実験を行った。

1-2-13. 統計処理

すべての結果は、平均値 \pm 標準偏差(SD)で示した。2 群間の平均値の比較は、Student's t 検定により評価した。P 値が 0.05 または 0.01 以下の場合、有意な差があると判断した。

1-3. 結果

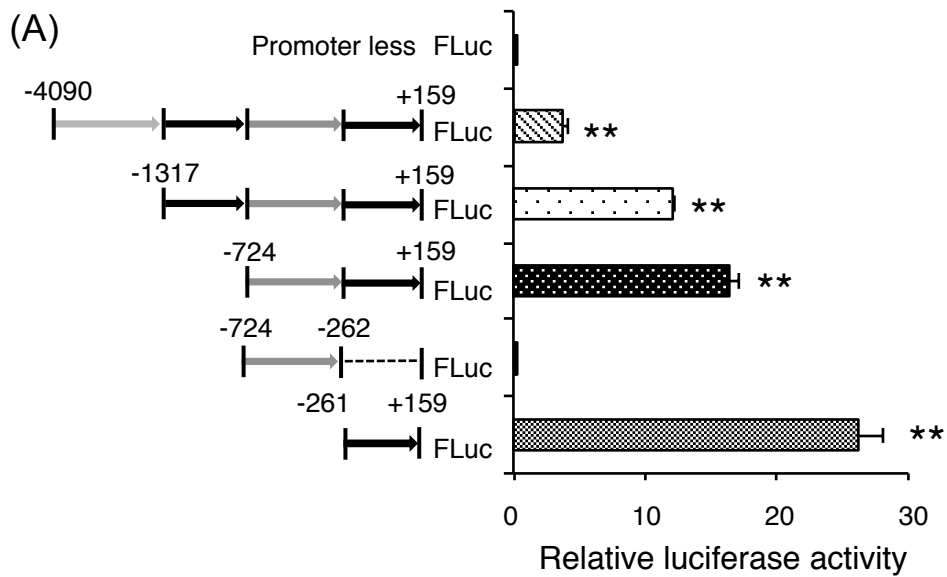
1-3-1. *YTHDC2* 遺伝子のプロモーター領域および転写因子の同定

BAC クローン(RP11-64F17)をテンプレートに *YTHDC2* 遺伝子の転写開始点より -4090 から+159 塩基までの領域を、ルシフェラーゼ発現ベクターに組み込み、そのベクターを用いてルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。図表 1-1A に示すようにプロモーターを付けていない場合は反応がなかったが、*YTHDC2* 遺伝子の転写開始点より -4090 から+159 塩基までの領域をルシフェラーゼ発現ベクターに組み込んだ場合、反応が見られた。次に、-4090 から+159 塩基の領域について欠失変異体を作製し、ルシフェラーゼレポーターアッセイを行った。その結果、図表 1-1A に示すように転写開始点より -261 から+159 塩基の領域を欠失させたときのみ、反応が大きく低下した。

TFSEARCH データベース(<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html>)による解析を行った結果、図表 1-1(B)に示したように、-261 から+159 塩基の領域内には cAMP Response Element(CRE)、GATA、AP-1 の 3 種類の転写因子結合サイトが含まれていることがわかった。それら 3 種類の結合サイトの中でどれが重要であるか調べるためにそれぞれのサイトに表 1-7 に示したように変異を導入し、再度ルシフェラーゼアッセイを行った。実験の結果、GATA および AP-1 サイトに変異を導入しても、反応はほとんど変化しなかったが、CRE サイトに変異を導入したときのみ反応が大きく低下した(図表 1-1C)。

これまでの研究で、CRE には CREB、ATF-2、c-Jun などの転写因子がホモダイマーもしくはヘテロダイマーを形成して結合することがわかっている^(16, 17)。筆者は、CREB、ATF-2、c-Jun のいずれが *YTHDC2* 遺伝子のプロモーター領域の CRE サイトに結合するかをクロマチン免疫沈降法(ChIP)により解析した。その結果、*YTHDC2* の CRE サイトには CREB ではなく c-Jun と ATF-2 が結合して

いることがわかり(図表 1-1D)、この 2 つの転写因子が YTHDC2 の転写制御に重要であることが示唆された。



(B)

-261 TGGCTCTCTG GTTCTCCAAT GTACATCGAA GCGTGGCAT AATGCCAGGT

-211 CCACAGTAGA AGCCCATACA TGCTTACTGC AGGAATTAAT GAAGGACTAA

-161 ACGAAGTAGC AAGTGAGTGA ATAAGAAGAT GAGGAGCGAC CCTTGGTGGG

-111 CGGCGCGGGA AGAGAACCGC ACCATAGCTC CGCAGACAGC CTCCTTTAGG

CRE

-61 CGCGCAGCGG CGGCCGCGCT GAGGTCACGG GCGCCGGCCC TGG**TGACGTC**

GATA

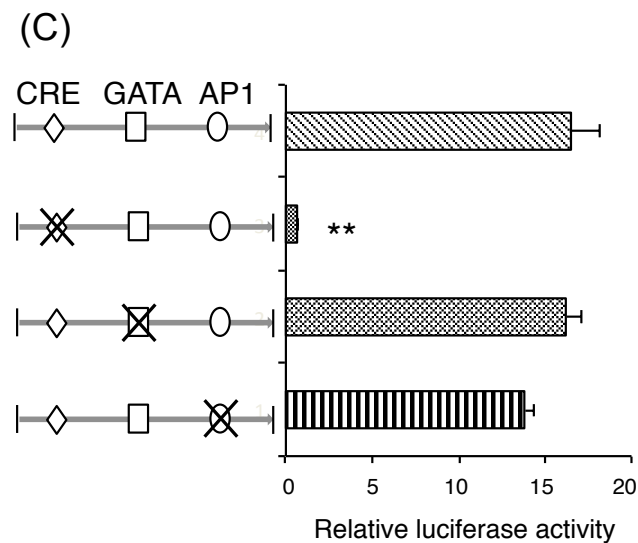
-11 **A**TTACGCCCCG CGCTCCTCGC CTGGC**CGTGA TATCA**ATGGC GCAGGCTTCA

AP-1

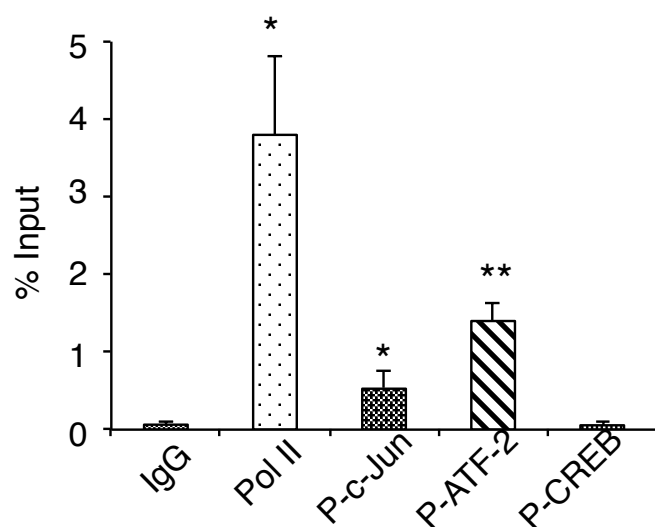
+39 CTTCTGCTGT GCGGG**TGACT** **G**AGGCCTTTC TGGTGACCTC AGCCCAACAC

+89 AGGCCGTCTC CGGAGCTTCC CGGTAGTGGC CCCGGATTCC CACGGTCTTT

+139 GTCATTGGCT GTCAGCTAGC



(D)

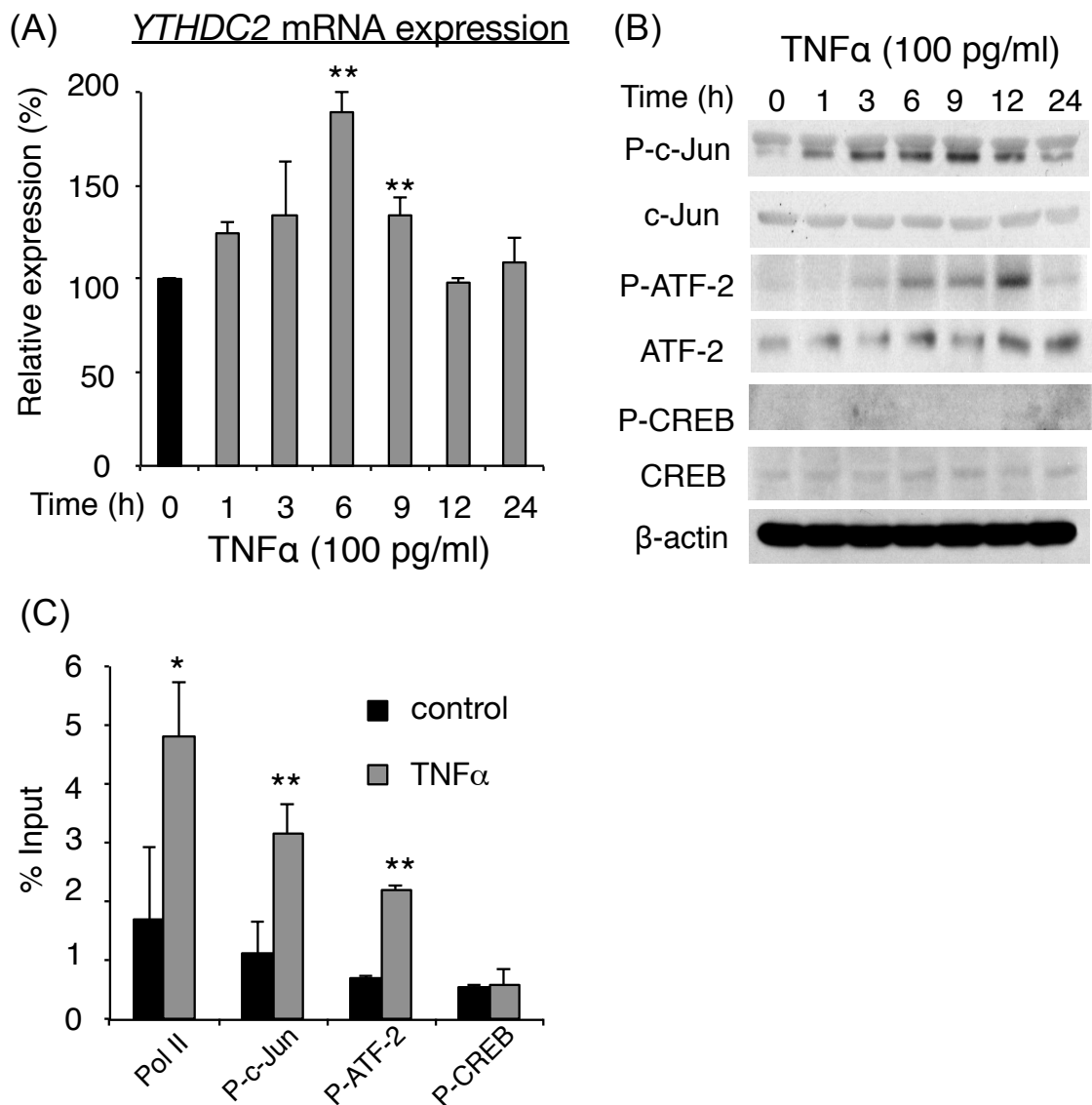


図表 1-1. *YTHDC2* 遺伝子のプロモーター領域および転写因子の同定

(A) 縦軸の矢印はルシフェラーゼ発現ベクターに組み込んだプロモーター領域を示し、横軸はそれぞれのプロモーターの活性を示している。(** $P < 0.01$ vs. Promoter less) (B) *YTHDC2* 遺伝子のプロモーター領域の塩基配列とその領域に存在する 3 種類の転写因子結合サイトを示している。(C) ルシフェラーゼレポーターアッセイによる転写因子結合サイトの同定。縦軸は変異を導入した結合サイトを示し、横軸はそれぞれのプロモーターの活性を示している。(** $P < 0.01$ vs. 野生型) (D) クロマチン免疫沈降法(ChIP)の結果。横軸は免疫沈降した転写因子を示し、縦軸は各転写因子の抗体で免疫沈降できた *YTHDC2* 遺伝子のプロモーター領域の DNA 量と免疫沈降を行っていない Input DNA 中に含まれる *YTHDC2* 遺伝子のプロモーター領域の DNA 量の比率を示している。(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. control IgG)

1-3-2. ヒト正常肝細胞における TNF α 刺激による YTHDC2 転写誘導機構

炎症性サイトカイン TNF α をヒト正常肝細胞に処理することで YTHDC2 の発現が誘導されることが報告されている⁽¹⁰⁾。そこで、TNF α 刺激時も c-Jun と ATF-2 が活性化し、YTHDC2 の転写が誘導されているかを解析した。YTHDC2 の転写誘導は TNF α 刺激後 6 時間でピークに達する(図 1-2A)。c-Jun のリン酸化は TNF α 刺激後 1 時間から 12 時間の間で増加し、ATF-2 のリン酸化は 3 時間から 12 時間の間で増加していたが、CREB のリン酸化は見られなかった(図 1-2B)。次に、リン酸化誘導された c-Jun と ATF-2 が YTHDC2 遺伝子のプロモーター領域に結合しているか確認するため、ChIP アッセイを行った。ChIP アッセイの結果、TNF α 刺激により YTHDC2 遺伝子のプロモーター領域に結合するリン酸化 c-Jun(P-c-Jun)とリン酸化 ATF-2(P-ATF-2)が増加することがわかった(図 1-2C)。これらの結果から、ヒト正常肝細胞でも TNF α で刺激されることで癌細胞と同じ転写因子が活性化し、YTHDC2 の転写が誘導されることが示唆された。



図表 1-2. TNFα 刺激による *YTHDC2* の転写誘導

(A) TNFα 刺激したヒト正常肝細胞における *YTHDC2* mRNA の発現量の解析。
 (**P<0.05 vs. control) (B) TNFα 刺激したヒト正常肝細胞における各転写因子のタンパク質発現量の解析。 (C) クロマチン免疫沈降法(ChIP)の結果。横軸は免疫沈降した転写因子を示し、縦軸は各転写因子の抗体で免疫沈降できた *YTHDC2* 遺伝子のプロモーター領域の DNA 量と免疫沈降を行っていない Input DNA 中に含まれる *YTHDC2* 遺伝子のプロモーター領域の DNA 量の比率を示している。
 (*P<0.05, **P<0.01 vs. control)

1-4. 考察

本章における結果により、*YTHDC2* 遺伝子の転写開始点より -261 から +159 塩基の領域に存在する CRE サイトとそこに結合する転写因子 c-Jun と ATF-2 が *YTHDC2* の転写に重要であることが明らかになった。ルシフェラーゼレポーターアッセイにおいて CRE サイトは免疫細胞や神経細胞のシグナル伝達経路において中枢的な役割を果たしている^(18, 19)。一般的に、CRE サイトに結合する転写因子としてよく知られているのは CREB であるが、*YTHDC2* の CRE サイトには CREB の結合は確認されず、c-Jun と ATF-2 の結合のみが確認された(図表 1-1D, 1-2C)。c-Jun と ATF-2 は AP-1 ファミリーに属する転写因子であり、ロイシンジッパーモチーフを介して他の転写因子とホモダイマーもしくはヘテロダイマーを形成し、CRE サイトに結合することが報告されている^(16, 17, 20, 21)。c-Jun と ATF-2 は細胞の増殖や分化などの様々な細胞応答を調節する。いくつかの研究はこれらの転写因子が細胞の増殖、生存に関わる遺伝子発現を活性化することで細胞の癌化を促進していることを示している^(20, 21)。

炎症性サイトカイン TNF α の主要な生理活性は、転写因子 NF- κ B を活性化することで発揮される。TNF α が TNF 受容体 1(TNFR1)に結合すると、TNF 受容体関連デスドメインタンパク質(TRADD)、TNF 受容体関連因子 2/5(TRAF2/5)、受容体共役タンパク質 1(RIP1)そしてアポトーシス阻害因子 1/2(cIAP1/2)などの分子が TNFR1 の細胞質領域に集合し、I κ B キナーゼ (IKK)のリン酸化を誘導する⁽²²⁾。リン酸化 IKK は、I κ B をリン酸化することで分解を促進する。I κ B が分解されたことで NF- κ B は核に移行し、抗アポトーシスタンパク質や炎症性サイトカインの発現を活性化する⁽²³⁾。NF- κ B シグナル経路における役割に加えて、TRAF2/5 と RIP1 は c-Jun N 末端キナーゼ(JNK)や p38 キナーゼの活性化にも関与している^(22, 24)。活性化した JNK と p38 は c-Jun や ATF-2 などのリン酸化を促進

する。本研究において、c-Jun のリン酸化は TNF α 刺激後 1 時間から 12 時間にかけて誘導され、ATF-2 のリン酸化は TNF α 刺激後 3 時間から 12 時間にかけて誘導された。それと対照的に CREB のリン酸化誘導は観察されなかった。c-Jun は 63 番目と 73 番目のセリン残基が JNK によってリン酸化され、ATF-2 は 69 番目と 71 番目のスレオニン残基が JNK と p38 によってリン酸化される^(20, 24)。これらの部位のリン酸化修飾は c-Jun と ATF-2 が生理的活性を発揮する上で非常に重要である。YTHDC2 遺伝子のプロモーター領域に対する c-Jun と ATF-2 の結合量も TNF α によるリン酸化誘導によって増加していた(図 1-2C)。まとめると、ヒト正常肝細胞において TNF α 刺激が引き金となり活性化した c-Jun と ATF-2 が YTHDC2 遺伝子のプロモーターに結合することで YTHDC2 の発現が誘導されることが明らかになった。

ヒトの生体内で肝細胞が TNF α に曝露される原因の 1 つとして HCV の感染が想定される。HCV の感染初期に、主にクッパー細胞から TNF α が分泌される^(25, 26)。HCV のゲノム複製に YTHDC2 が寄与することから⁽¹⁰⁾、HCV 感染により分泌された TNF α が YTHDC2 の発現を惹起させ、誘導された YTHDC2 を HCV がゲノム複製に利用するというポジティブ・フィードバック経路が考えられる。これらのことから、c-Jun と ATF-2 の上流に位置するシグナル伝達経路を阻害することで、YTHDC2 の発現誘導を抑制し、HCV の慢性感染とそれに伴う細胞の癌化を予防できる可能性が示唆される。

続く第 2 章からは、癌細胞における YTHDC2 の生物学的役割、とくに癌細胞の転移における役割について解析した。

第 2 章 YTHDC2 による癌転移促進効果の解析

2-1. 序論

近年、いくつかの DExD/H box RNA ヘリカーゼが癌の増殖や転移において重要な役割を果たしていることが報告されている^(8,9,15)。筆者らは癌細胞の増殖において YTHDC2 が重要な役割を果たしていることを報告したが⁽²⁷⁾、YTHDC2 が癌細胞の転移に与える影響についてはまだほとんどわかっていない。

そこで本実験では、YTHDC2 が癌転移においてどのような役割を果たしているか解析した。本章で使用したヒト大腸癌細胞株 HCT116 細胞は他のヒト大腸癌細胞株に比べて、高い肝転移能力を持つことが報告されている⁽²⁸⁾。筆者は、*in vitro* および *in vivo* の実験で細胞の運動や転移の様子を観察しやすいと考え、HCT116 細胞を用いて実験を行った。まず shRNA を用いて内在性の YTHDC2 発現を抑制したヒト大腸癌細胞株を樹立した。樹立した細胞株の運動能力や転移能力を Wound Healing アッセイ、Transwell アッセイ、ヌードマウスを使った異種移植モデルなどで評価した。さらに、大腸癌患者 72 症例の病理組織標本における免疫組織化学的観察により、ヒト大腸癌の進行度と YTHDC2 の発現に相関があるかどうかを外科病理学的に評価した。

2-2. 材料と方法

2-2-1. 細胞培養

ヒト大腸癌細胞株 HCT116 細胞は RPMI-1640(Sigma-Aldrich)に 10% ウシ胎児血清、2 mM glutamine、100 U/ml penicillin、100 µg/ml streptomycin を添加したものを基本培地とし、37°C 5% CO₂ のインキュベーターで培養した。

2-2-2. shRNA の導入

YTHDC2 遺伝子の発現を安定的にノックダウンするため、HCT116 細胞に *YTHDC2* 遺伝子の特異的に認識する shRNA(*YTHDC2*-shRNA)をコードするベクターを包んだ MISSION shRNA Lentiviral Transduction Particles(Sigma-Aldrich)と既知のヒト遺伝子を標的としない shRNA(non-target shRNA)をコードするベクターを包んだ MISSION shRNA Lentiviral Transduction Particles(Sigma-Aldrich)を添加した。その後、1 μ g/ml Puromycin を加えて培養し、それぞれ Y2-KD 細胞と sh-cont 細胞とした。そして、細胞を 96 well プレートに 0.5 cells/well となるように播種した。培養後、回収した細胞の *YTHDC2* 遺伝子の発現を定量的 real-time PCR およびウエスタンブロット法によって解析した。

2-2-3. 定量的 real-time PCR

YTHDC2 と *G6PDH* の定量的 real-time PCR は、第 1 章と同様の方法で行った。

2-2-4. ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)とウエスタンブロット法

ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)とウエスタンブロット法は第 1 章と同様の方法で行った。*YTHDC2* の検出には、共同研究者である当研究室所属の谷川が樹立したハイブリドーマの培養上清を一次抗体として使用した。このハイブリドーマは *YTHDC2* を特異的に認識するモノクローナル抗体を産生する(谷川賢弥、2014、修士論文)。 β -actin の検出は、一次抗体として 5000 倍希釈した抗 β -actin 抗体を使用した。*YTHDC2* と β -actin の検出には二次抗体として Peroxidase を標識した抗 Mouse IgG 抗体を 2000 倍希釈して用いた。化学発光の検出には、ImageQuant LAS 4000(GE Healthcare)を使用した。

2-2-5. Wound Healing アッセイ

実験に際し、sh-cont 細胞または Y2-KD 細胞を 5×10^5 cells/well の濃度で 24 well plate(BD Falcon)に基本培地を用いて培養した。細胞がコンフルエントになったのを確認した後、滅菌したイエローチップの先端を用いて一筋の傷ができるように細胞を剥がした。剥がれた細胞を PBS で Wash して、ウシ胎児血清の濃度を 0.5%に減らした低血清培地を加えた。傷を付けた直後と 24 時間後の写真を 1 well あたり 3 ヶ所ずつ撮影したあと、ImageJ ソフトウェアを用いて傷の面積を定量し、平均を求めた。

2-2-6. Transwell アッセイ

Transwell アッセイには 8 μ m のポアサイズの Transwell Insert(Thermo Fisher Scientific)を使用した。実験に際し、sh-cont 細胞と Y2-KD 細胞を 1×10^6 cells/dish の濃度で 60 mm dish (BD Falcon)に無血清培地で一晚培養した。翌日、 1×10^5 の細胞を 0.2 ml の無血清培地に懸濁し、Transwell Insert の上部に入れた。細胞を入れた Transwell Insert を牛胎児血清の濃度を 20%に増やした高血清培地 0.8 ml が入っている 24 well plate にセットした。48 時間のインキュベーションの後、ギムザ染色液で細胞を染色し、Transwell Insert の上部に残った細胞を綿棒で取り除いた。その後、顕微鏡で Transwell Insert の下部に浸潤した細胞を撮影し、1 well あたり無作為に選んだ 5 つの視野における細胞数を数えてその平均を求めた。

2-2-7. YTHDC2 遺伝子発現ベクターの作製

表 2-1 で示したプライマーを用いて PCR を行い、YTHDC2 遺伝子のコーディング領域(CDS)をクローニングし、pCRII-TOPO ベクターに組み込んだ。そのベクターから制限酵素 BamHI および Not I で YTHDC2 遺伝子の CDS を切り出し、

同じ制限酵素で処理した pcDNA3.1 myc/HisA ベクター(Thermo Fisher Scientific) に組み込んだ。YTHDC2 CDS のクローニングには、MH14 細胞由来の ssDNA ライブラリーをテンプレートとして用い、LA-Taq DNA polymerase System により PCR を行った。

表 2-1. 第 2 章で使用したプライマーの塩基配列

Set number	Name	Sequence (5' → 3')
1	YTHDC2 CDS	F: ATGTCCAGGCCGAGCAGCGT R: ATCAGTTGTGTTTTTTCTCCC

F: Forward primer

R: Reverse primer

2-2-8. PCR

PCR は LA-Taq DNA polymerase System 用いて、第 1 章と同様の方法で行った。

2-2-9. ライゲーション反応

pCRII-TOPO ベクターを使用したライゲーション反応は、TOPO TA Cloning Kit を使用し、第 1 章と同様の方法で行った。pcDNA3.1 myc/HisA ベクター使用したライゲーション反応は、T4 DNA のシステムを使用し、第 1 章と同様の方法で行った。

2-2-10. 大腸菌の形質転換

第 1 章と同様の方法で行った。

2-2-11. Y2-KD 細胞に対する YTHDC2 遺伝子発現ベクターの導入実験

処理前日に Y2-KD 細胞を 5×10^5 cells/dish の濃度で 35 mm dish (BD Falcon) に

基本培地を用いて培養した。翌日、基本培地を無血清培地に交換し、37°Cで 30 分間インキュベートした。その間に、2 µg/dish Polyethyleneimine “MAX” (Polysciences, Inc, PA, USA)を 100 µl/dish Opti-MEM に混和し、5 分間静置した。*YTHDC2* 遺伝子発現ベクターまたは遺伝子を組み込んでいない空の pcDNA3.1 myc/HisA ベクター(empty vector)も同様に 100 µl/dish Opti-MEM に混和し、5 分間静置した。5 分後、それぞれの溶液を混和し、総量が 200 µl/dish の混和溶液を作製し、さらに 20 分間静置した。20 分後、その混和溶液を dish に添加し、24 時間培養した。24 時間後に回収した細胞を用いて、Total RNA の回収と Transwell アッセイを行った。

2-2-12. ノードマウスを使用した異種移植モデル実験

日本 SLC 株式会社(Shizuoka, Japan)より 7 週齢のメスのノードマウス(BALB/c nu/nu mice)を購入した。野生型 HCT116、sh-cont 細胞および Y2-KD 細胞を 2×10^7 cells/ml の濃度で PBS に懸濁した。イソフルランで吸入麻酔したノードマウスの左腹部の皮膚を 1 cm ほど切開し、半透明な筋層を通して脾臓が観察できるようにしてから、用意した細胞懸濁液 50 µl(1×10^6 cells)を脾臓に移植した。切開した皮膚は術用クリップで縫合した。シクロスポリン A(CsA)の癌転移抑制効果を調べるために野生型 HCT116 を移植したノードマウスに対して、細胞移植後 3～6 週間の期間中に生理食塩水または CsA(10 mg/kg)を毎日腹腔内投与した。細胞移植後 6 週間が経過した後、致死量のペントバルビタールを腹腔内投与することでノードマウスを安楽死させた。ノードマウスを解剖し、脾臓で発生した原発腫瘍と肝臓における転移巣を観察した。(動物実験承認番号：130226-5)

2-2-13. ヒト大腸癌組織の免疫組織化学染色

札幌医科大学病院の大腸癌患者 72 名の組織標本を免疫組織化学のサンプルとした。この研究は札幌医科大学の IRB の承認を受けている。ホルマリン固定／パラフィン包埋組織を抗 YTHDC2 モノクローナル抗体で染色し Bond Polymer Refine Detection (Leica Biosystems, Tokyo, Japan) で検出した。組織全体で 75% 以上の細胞が染まった標本を 3+、25-75% の細胞が染まった標本を 2+、1-25% の細胞が染まった標本を 1+、染まった細胞が 1% 未満の標本を 0(陰性)として評価した。

2-2-14. 統計処理

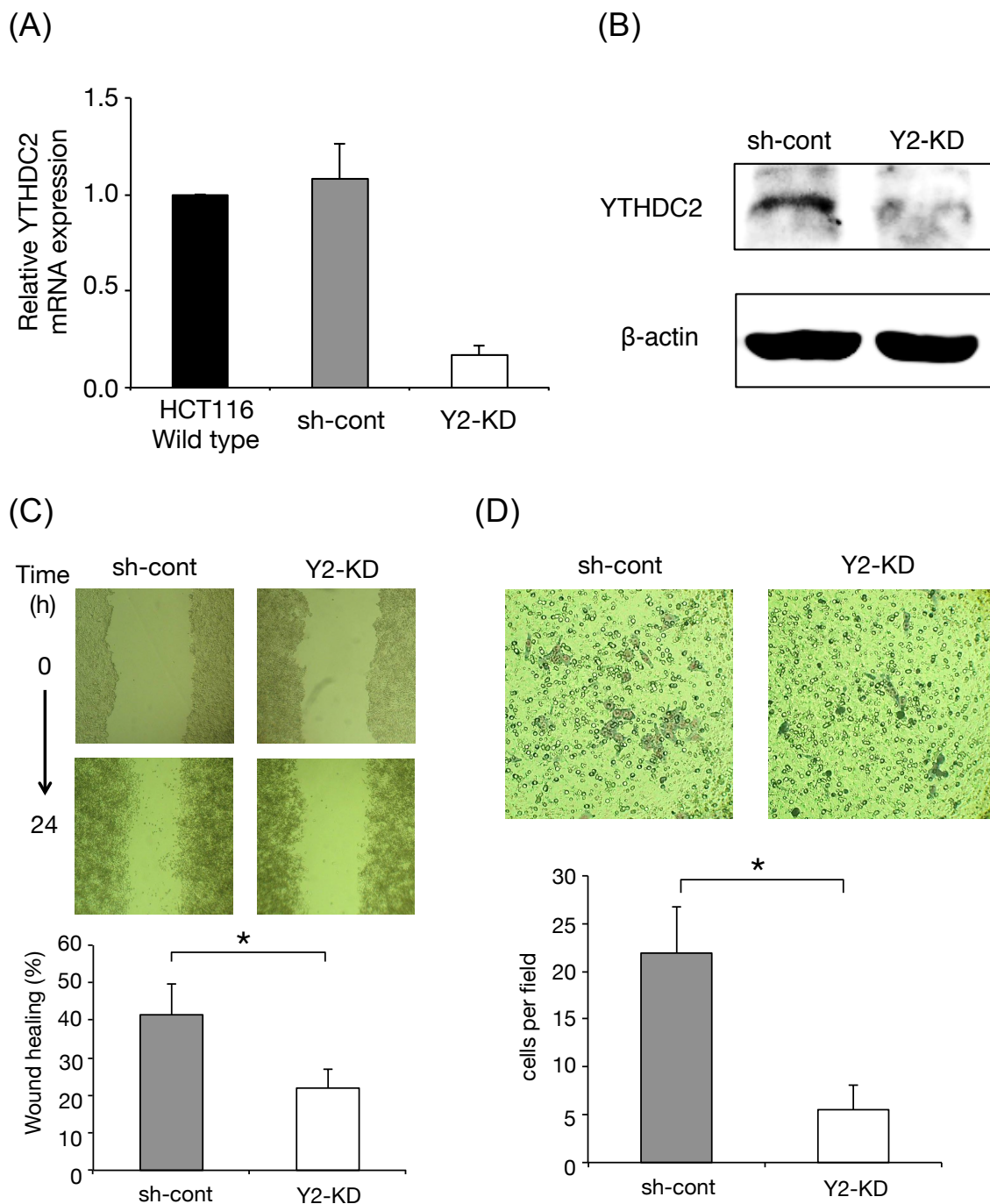
すべての結果は、平均値±標準偏差(SD)で示した。2 群間の平均値の比較は、Student's t 検定により評価した。P 値が 0.05 または 0.01 以下の場合、有意な差があると判断した。大腸癌取り扱い規約に基づく癌の進行度(stage)と YTHDC2 の陽性率の相関を調べるため、スピアマンの順位相関係数による検定を行い、相関係数{ $R(s)$ }を求めた。さらに癌のリンパ節転移の有無と YTHDC2 の陽性率に関連性があるか調べるためにマンホイットニ検定を行った。P 値が 0.05 または 0.01 より低い場合、統計的な有意差があると判断した。

2-3. 結果

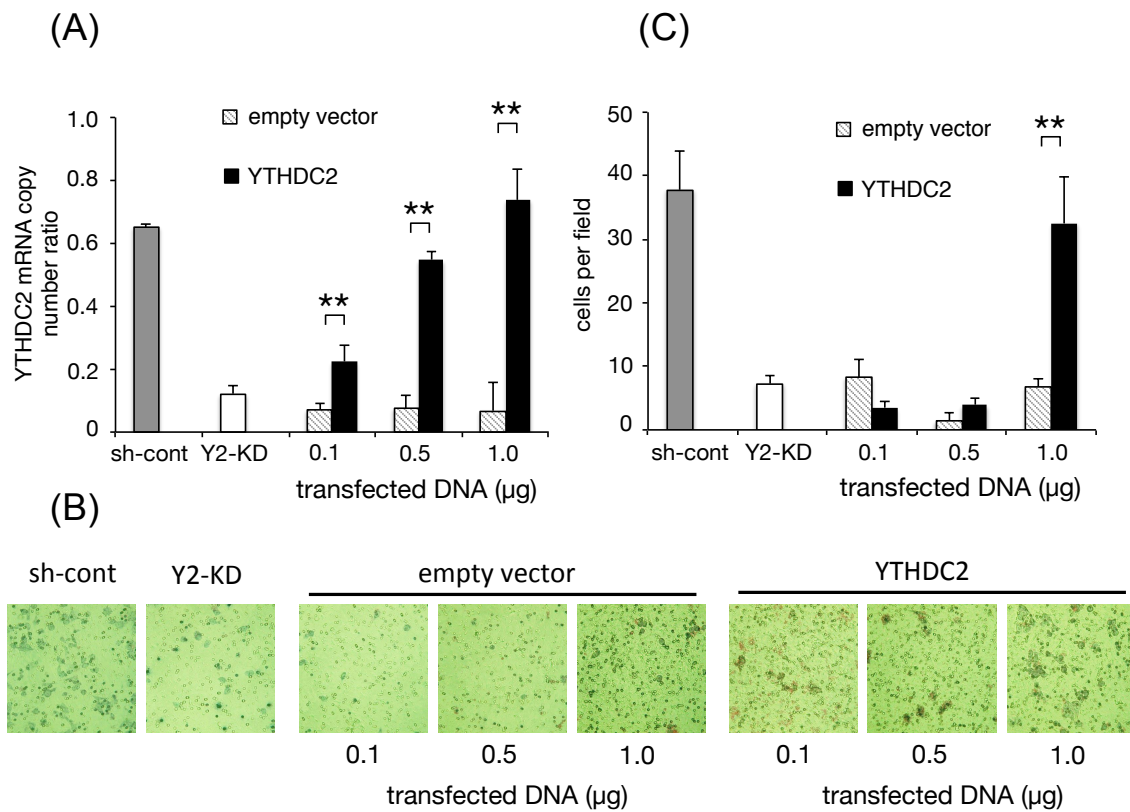
2-3-1. YTHDC2 ノックダウン大腸癌細胞の樹立および運動能力の解析

大腸癌細胞 HCT116 に既知のヒト遺伝子を標的としていない shRNA(non-target shRNA)と YTHDC2 を標的とする shRNA(YTHDC2-shRNA)をそれぞれ形質導入した。その後、Puromycin による薬剤選別によってそれぞれの shRNA が高効率で導入できた細胞を選別した。その結果、YTHDC2 の mRNA 発現量が野生型の HCT116 細胞とほとんど変わらないコントロール HCT116 細胞株(sh-cont 細胞)と YTHDC2 の mRNA 発現量が野生型の HCT116 細胞に比べて約 80%低下した YTHDC2 ノックダウン細胞株(Y2-KD 細胞)を樹立することに成功した(図表 2-1A)。Y2-KD 細胞における YTHDC2 のタンパクレベルでの発現は sh-cont 細胞に比べて大きく低下していた(図表 2-1B)。これらの細胞株を用いて以降の実験を行った。樹立した細胞株の運動能力を Wound Healing アッセイと Transwell アッセイによって解析した。Wound Healing アッセイは、高密度で培養されている細胞が人工的に作った新しいスペース(Wound)に移動する量を調べることで二次元的な細胞運動能力を測定する方法である。Transwell アッセイは、細胞が Transwell のメンブレンに開いている 8 μ m の穴を通り抜けて反対側に移動した量を調べることで三次元的な運動能力を測定する方法である。*in vitro* における 2 種類の運動能力測定法により、Y2-KD 細胞の運動能力が sh-cont 細胞に比べて大きく低下していることがわかった(図表 2-1C, D)。さらに YTHDC2 が細胞の運動能力に関与しているか確かめるために、Y2-KD 細胞に対して YTHDC2 遺伝子発現ベクターを導入し、YTHDC2 を再発現させた状態で Transwell アッセイを行った。YTHDC2 の mRNA 発現量を定量的 real-time PCR で調べた結果、empty vector を導入した Y2-KD 細胞では YTHDC2 の mRNA 発現量に変化はなかったが、YTHDC2 遺伝子発現ベクターを導入した Y2-KD 細胞では、導入した DNA 量に

従い、*YTHDC2* の mRNA 発現量が増加していることを確認した(図表 2-2A)。それらの細胞を使用して Transwell アッセイを行った結果、*YTHDC2* 遺伝子発現ベクターを導入した Y2-KD 細胞の運動能力が sh-cont 細胞とほぼ同程度まで回復したことが示された(図表 2-2B, C)。これらの結果から *YTHDC2* が大腸癌細胞の運動能力に関与していることが示唆された。



図表 2-1. YTHDC2 のノックダウン細胞の樹立および運動能力の解析
 (A) 野生型 HCT116 細胞、sh-cont 細胞および Y2-KD 細胞における *YTHDC2* mRNA の発現量の解析。(B) sh-cont 細胞と Y2-KD 細胞における YTHDC2 タンパク質の発現量の解析。(C) Wound healing アッセイによる運動能力の解析。グラフの縦軸は細胞の移動によって傷が修復された割合を示している。(* $P < 0.05$ vs. sh-cont) (D) Transwell アッセイによる運動能力の解析。グラフの縦軸は顕微鏡の 1 視野で数えられた細胞数の平均を示している。(* $P < 0.05$ vs. sh-cont)

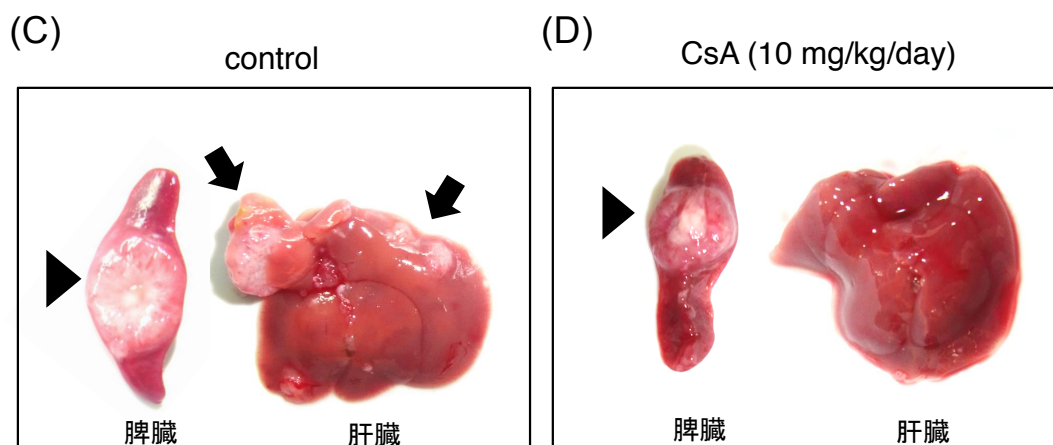
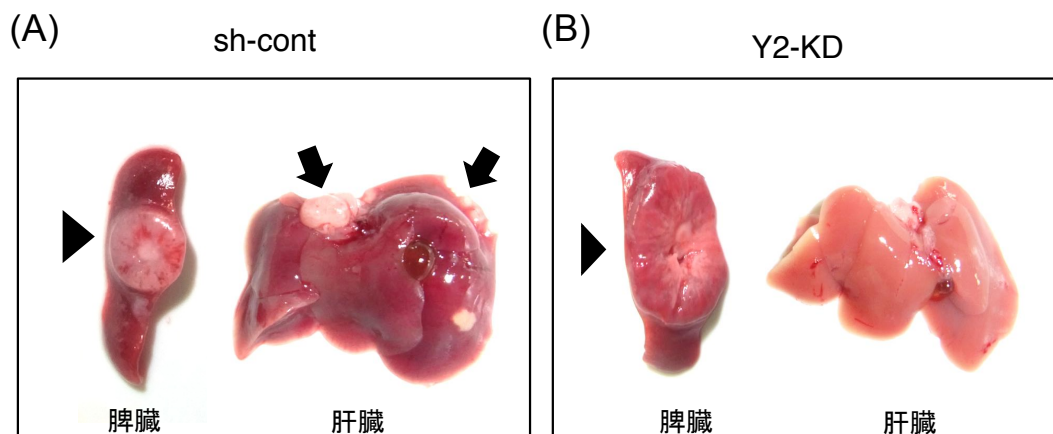


図表 2-2. YTHDC2 を再発現させた Y2-KD 細胞の運動能力

(A) sh-cont 細胞、Y2-KD 細胞、empty vector または *YTHDC2* 遺伝子発現ベクター (*YTHDC2*)を導入した Y2-KD 細胞における *YTHDC2* の mRNA 発現量の解析。(B) Transwell アッセイによる運動能力の解析。写真の下に導入した DNA 量をそれぞれ示している。(C) グラフの縦軸は顕微鏡の 1 視野で数えられた細胞数の平均を示している。(** $P < 0.01$ vs. empty vector)

2-3-2. ノードマウスを用いた転移能力の解析

続いて、*in vivo* における転移能力を解析するため、それぞれの細胞株をノードマウスの脾臓に移植し、肝転移の有無を観察した。sh-cont 細胞を脾臓に移植し、固形腫瘍を形成した 6 例について肝転移の有無を解析した結果、6 例中 6 例で肝転移が認められた(図 2-3A, E)。一方で Y2-KD 細胞を移植して固形腫瘍を形成した 5 例で肝転移が認められたのは 2 例のみであった(図 2-3B, E)。これらの結果から YTHDC2 は大腸癌細胞の転移能力に寄与していることが示唆された。次に、薬剤によって YTHDC2 の機能を阻害することで大腸癌細胞の転移を抑制できるか否かを解析した。実験には YTHDC2 のヘリカーゼ活性を抑制することが報告されている免疫抑制剤シクロスポリン A(CsA)を使用した⁽¹⁰⁾。野生型の HCT116 をノードマウスの脾臓に移植し、移植後 3 週間目から 6 週間目にかけてコントロール群には生理食塩水を、CsA 投与群には CsA(10 mg/kg)を毎日腹腔内投与した。コントロール群において脾臓に固形腫瘍を形成した 5 例について肝転移の有無を解析した結果、5 例中 5 例全てで肝転移が認められた(図表 2-3C, F)。一方で、CsA 投与群では、脾臓に固形腫瘍を形成した 5 例中 2 例のみしか肝転移が観察されなかった(図表 2-3D, F)。これらのことから CsA により YTHDC2 のヘリカーゼ活性が阻害されたことで大腸癌細胞の転移能力が抑制されたことが示唆された。



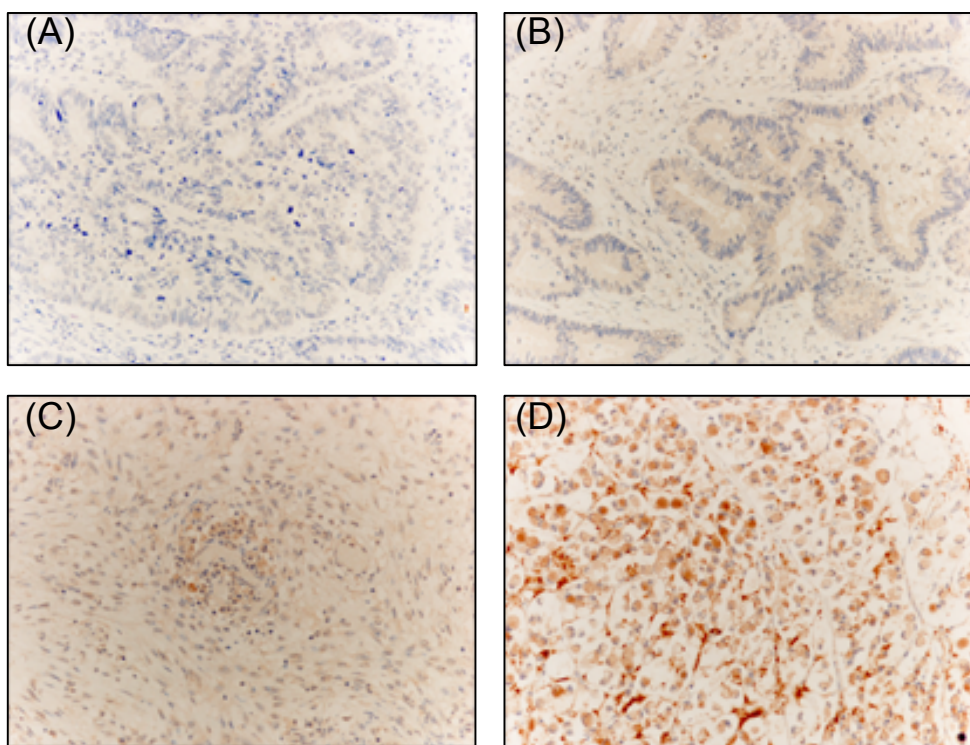
	No. of nude mice			No. of nude mice	
	sh-cont	Y2-KD		control	CsA
原発癌(脾臓)	6/6	5/5	原発癌(脾臓)	5/5	5/5
肝転移	6/6	2/5	肝転移	5/5	2/5

図表 2-3. 癌転移における YTHDC2 の役割

(A) sh-cont 細胞を移植したヌードマウスの脾臓と肝臓の写真。(B) Y2-KD 細胞を移植したヌードマウスの脾臓と肝臓の写真。(C) 野生型 HCT116 細胞を移植し、生理食塩水を投与したヌードマウスの脾臓と肝臓の写真。(D) 野生型 HCT116 細胞を移植し、CsA を投与したヌードマウスの脾臓と肝臓の写真。写真上の矢尻が脾臓における原発癌を、矢印が肝臓の転移巣をそれぞれ示している。(E) sh-cont 細胞または Y2-KD 細胞の肝転移の頻度。(F) 生理食塩水(control)または CsA を投与した場合の肝転移の頻度。

2-3-3. ヒト大腸癌の進行度と YTHDC2 発現の相関

本研究は、札幌医科大学医学部病理学第一講座教授 鳥越俊彦博士ならびに消化器・総合、乳腺・内分泌外科学講座講師 九富五郎先生、助教・前田豪樹先生、助教・沖田憲司先生との共同研究で行った。大腸癌患者 72 症例の病理組織標本を共同研究者である谷川が作製した抗 YTHDC2 モノクローナル抗体を用いて免疫組織化学染色した(図 2-4A-D)。大腸癌の進行度(stage)と YTHDC2 の陽性率に相関があるかどうかをスピアマンの順位相関係数の検定により解析し、また、大腸癌のリンパ節転移の有無と YTHDC2 の陽性率に関係性があるかどうかをマンホイットニ検定で解析した。スピアマンの順位相関係数の検定の結果、相関係数{ $R(s)$ }の値は 0.440(P 値=0.0002)であったため、大腸癌の進行度と YTHDC2 の陽性率には有意な正の相関があることがわかった(図表 2-4E)。さらにマンホイットニ検定の結果、Z 値は-0.2518(P 値=0.0118)であったため、リンパ節転移がある大腸癌の方が YTHDC2 の進行度が有意に高いことがわかった(図表 2-4E)。これらの結果から、ヒト大腸癌の転移を伴う進行にも YTHDC2 が関与していることが示唆された。



(E)

	YTHDC2 positive rate				R(s) [*] /z ^{**}	P-value
	0	1+	2+	3+		
Tumor stage						
I	3	5	2	0	0.440*	0.0002
II	0	10	8	8		
III	0	5	12	14		
IV	0	1	1	3		
Lymph node metastasis						
Negative	3	15	11	10	-2.518**	0.0118
Positive	0	6	12	15		

図表 2-4. ヒト大腸癌組織における YTHDC2 の陽性率

写真は抗 YTHDC2 モノクローナル抗体により免疫組織化学染色したヒト大腸癌組織標本の代表例を示している。(A) 0(陰性)、(B) 1+(陽性率 1~25%)、(C) 2+(陽性率 25~75%)、(D) 3+(陽性率 75%以上)、(E) ヒト大腸癌 72 例における YTHDC2 の陽性率と癌の進行度(stage)の関係および YTHDC2 の陽性率とリンパ節転移の有無の関係を示している。(*スピアマンの順位相関係数の検定、 **マンホイットニ検定)

2-4. 考察

本章において、shRNA により YTHDC2 の発現を抑制することで大腸癌細胞の運動能力が有意に抑制された(図表 2-1C, D)。その運動能力の低下が YTHDC2 を細胞に再発現させることで回復したため(図表 2-2A-C)、YTHDC2 が細胞の運動能力に寄与していることが強く示唆された。大腸癌などの上皮性の癌細胞が運動・転移能力を得るためには細胞の上皮間葉転換(EMT)が重要な過程である^(11, 12)。EMT が亢進している癌細胞は E カドヘリンなどの細胞接着因子が減少しているが、一方で正常な上皮組織や悪性度の低い癌細胞では細胞接着因子の発現が高く、細胞同士が強く結びついている^(11, 12)。データとして示していないが、第 2 章で使用した Y2-KD 細胞は sh-cont 細胞に比べると細胞塊を形成しやすく、細胞同士の結合力が強いことが示唆されている。今後、Y2-KD 細胞における細胞接着因子の発現量を解析することが必要であると考えられる。

筆者は、*in vivo* における転移能力を解析するためにヌードマウスを使った転移モデル実験を行った。以前の研究で YTHDC2 がヒト肝癌細胞の増殖能力に関与することが示唆されたが⁽²⁷⁾、本研究においてヌードマウスの脾臓で形成された原発癌の大きさには sh-cont 細胞と Y2-KD 細胞の間に差は見られなかった(図表 2-3A, B)。一方で、肝転移の頻度は Y2-KD 細胞において顕著に低下していた(図表 2-3A, B, E)。これらの結果から、YTHDC2 が大腸癌細胞の転移能力に寄与していることが示唆された。*in vivo* において遠隔転移が成立するには、細胞の運動能力が向上することだけではなく、細胞外基質や血管壁への浸潤能力、体内を循環している間の生存能力、新しい臓器内に適応して増殖することなど様々な要素が必要になる^(11, 12)。転移が成立するための様々な要素と YTHDC2 の関係について明らかにしていくことが、今後の重要な課題である。また、Y2-KD 細胞の肝転移の頻度は sh-cont 細胞に比べると 40%まで低下したが、完全に肝転移

を止めることは出来なかった(図表 2-3A, B, E)。その原因として shRNA による YTHDC2 ノックダウンの効果が全く無かった細胞、もしくは効果が弱かった細胞が肝臓に転移してしまった可能性が考えられる。第 2 章ではさらに、CsA による大腸癌細胞の肝転移抑制効果を観察した(図表 2-3C-E)。CsA は YTHDC2 のヘリカーゼ活性を阻害することから⁽¹⁰⁾、YTHDC2 が転移促進効果を発揮するためには、ヘリカーゼとして細胞内の RNA に作用することが重要であると考えられる。

筆者は、実際のヒト大腸癌の進行度と YTHDC2 の発現の相関について免疫組織化学染色を用いて解析した(図表 2-4A-E)。抗 YTHDC2 モノクローナル抗体は細胞の核ではなく細胞質を染色しており、これは YTHDC2 が小胞体に局在するというこれまでの報告と一致している⁽¹⁰⁾。スピアマンの順位相関係数による検定の結果、ヒト大腸癌の進行度と YTHDC2 の発現に正の相関が認められ、さらにマンホイットニ検定によりリンパ節転移を伴う大腸癌組織の方で YTHDC2 の発現が有意に高いことが示された。今回解析した大腸癌患者 72 症例のうち、遠隔転移を伴う症例が 10 例にも満たなかったため、遠隔転移の有無と YTHDC2 の発現との相関について解析することは出来なかった。今後、症例数を増やすことで遠隔転移の有無と YTHDC2 の発現に相関があるかどうか解析したいと考えている。本研究の構成には入っていないが、共同研究者である札幌医大の前田豪樹がヒト乳癌の進行度と YTHDC2 の発現の相関について解析している(2015、日本乳癌学会学術総会)。免疫組織化学染色による解析の結果、ヒト乳癌の進行度と YTHDC2 の染色強度に正の相関が認められた。これらの結果から、YTHDC2 がヒト大腸癌やヒト乳癌における予後予測因子または治療標的遺伝子となる可能性が示唆された。

第 3 章 YTHDC2 による HIF-1 α の翻訳促進機構の解析

3-1. 緒論

第 2 章の結果から、YTHDC2 が癌転移において重要な役割を果たしていることが示唆された。いくつかの DExD/H box 型 RNA ヘリカーゼは、mRNA からタンパク質が翻訳される過程を促進することで癌の悪性化に寄与することが報告されている^(8, 9, 15)。YTHDC2 も他の RNA ヘリカーゼと同様に遺伝子の翻訳過程に関わることが示唆されたため、共同研究者である谷川は、YTHDC2 の翻訳標的遺伝子の同定を行った(谷川賢弥、2014、修士論文)。谷川はショ糖密度勾配遠心法により sh-cont 細胞と Y2-KD 細胞の 40S リボソーム分画を回収し、そこに含まれる mRNA の発現量を cDNA マイクロアレイで網羅的に解析した。翻訳が開始段階で滞っている mRNA は 40S リボソームが結合したまま貯留しているので、YTHDC2 の翻訳標的遺伝子は YTHDC2 ノックダウン細胞の 40S リボソーム分画に大量に存在していることが予想された。マイクロアレイの結果、およそ 300 種類の mRNA が YTHDC2 ノックダウン細胞の 40S リボソーム分画に貯留していた。その中には低酸素環境で癌細胞の転移を促進する Twist1 などの転移関連遺伝子が含まれていたため、筆者らは低酸素環境における YTHDC2 の役割について解析を行った。その結果、低酸素誘導因子 1 α (Hypoxia Inducible Factor-1 α : HIF-1 α)が YTHDC2 の翻訳標的遺伝子として新たに同定された。

3-2. 材料と方法

3-2-1. 細胞培養

第 2 章と同様の方法で行った。低酸素実験の際には、マルチガスインキュベーターPrescyto MG-70M(TAITEC Co. Saitama, Japan)を使用して 1% O₂、94% N₂,

5% CO₂ の条件で細胞を培養した。

3-2-2. Total RNA 回収と逆転写反応

第 1 章と同様の方法で行った。

3-2-3. 定量的 real-time PCR

HIF-1 α と *β -actin* の定量的 real-time PCR は、第 1 章と同様の方法で行った。第 3 章の定量的 real-time PCR のために用いたプライマー(Sigma-Aldrich)は表 3-1 に示した。*G6PDH* は低酸素環境において発現が変化することが報告されているため⁽²⁹⁾、第 3 章では定量的 real-time PCR のインターナルコントロール遺伝子として *β -actin* を使用した。

表 3-1. 第 3 章で使用したプライマーの塩基配列

Set number	Name	Sequence (5' → 3')
1	β -actin	F: CACCAACTGGGACGACAT
		R: ACAGCCTGGATAGCAACG
2	HIF-1 α	F: CTGTCGCTTTGAGTCAAAGA
		R: GCATCCTTTTACACGTTTCC
3	HIF1 α 5'UTR	F: tttaagcttGCGCGCGCCGGCCTGGGC
		R: ttccatggGGTGAATCGGTCCCCGCGAT

F: Forward primer

R: Reverse primer

Lowercase letters indicate the restriction site

tttaagctt: HindIII site

ttccatgg: NcoI site

3-2-4. ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)とウェスタンブロット法

ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)とウェスタンブロット法は第 1 章と同様の方法で行った。 *β -actin* の検出は第 2 章と同様の方法で行った。*HIF-1 α* の検出には、一次抗体として 200 倍した抗 *HIF-1 α* 抗体(BD Falcon)を使用した。

HIF-1 α の検出には二次抗体として Peroxidase を標識した抗 Mouse IgG 抗体を 2000 倍希釈して用いた。化学発光の検出には、ImageQuant LAS 4000 を使用した。

3-2-5. mRNA 5'UTR の高次構造の解析

UTRdb データベース(<http://utrdb.ba.itb.cnr.it/>)を使用して、*HIF-1 α* の 5 末端非翻訳領域(5'UTR)の配列情報を取得した。その配列情報を RNAfold webserver (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>) に入力し、5'UTR の二次構造の予想図と最小自由化エネルギーの値を解析した。*HIF-1 α* の 5'UTR と比較するために、無作為に選んだ 300 種類の遺伝子についても同様の作業を行い、5'UTR の二次構造の最小自由化エネルギーを求めた。

3-2-6. ルシフェラーゼ発現ベクターの作製

HIF-1 α 遺伝子を含む BAC クローン(RPCI11.C 243C17-64F17)を Thermo Fisher Scientific から購入した。この BAC クローンをテンプレートに、Go-Taq DNA polymerase を使用した PCR により *HIF-1 α* の 5'UTR を増幅した。使用したプライマーは表 3-1 に示す。この PCR 産物を制限酵素 Hind III および Nco I で切り出し、同じ制限酵素で処理したホタルルシフェラーゼ発現ベクター ; pGL3-control vector の SV40 プロモーター領域とホタルルシフェラーゼ遺伝子の間に挿入した。

3-2-7. PCR

第 1 章と同様の方法で行った。

3-2-8. ライゲーション反応

第 1 章と同様の方法で行った。

3-2-9. 大腸菌の形質転換

第 1 章と同様の方法で行った。

3-2-10. 翻訳効率の測定のためのルシフェラーゼレポーターアッセイ

ルシフェラーゼレポーターアッセイに際し、処理前日に sh-cont 細胞または Y2-KD 細胞を 2.5×10^5 cells/well の濃度で 24 well plate(BD Falcon)に基本培地を用いて培養した。翌日、基本培地を交換し、37°C で 30 分間インキュベートした。その間に、2 μ g/well Polyethyleneimine “MAX”を 50 μ l/well Opti-MEM に混和し、5 分間静置した。HIF-1 α の 5'UTR を組み込んだ pGL4.10-Luc ベクター(1 μ g)とインターナルコントロールとしてウミシイタケルシフェラーゼ発現ベクターである pGL4.74-Luc ベクター(40 ng)も同様に 50 μ l/well Opti-MEM に混和し、5 分間静置した。5 分後、それぞれの溶液を混和し、総量が 100 μ l/well の混和溶液を作製し、さらに 20 分間静置した。20 分後、その混和溶液を well に添加し、酸素濃度 1%の低酸素環境で 24 時間培養した。24 時間後、細胞を回収し、ホタルルシフェラーゼとウミシイタケルシフェラーゼの活性を Dual-Luciferase Reporter Assay System を用いて測定し、比率を求めた。比率=ホタルルシフェラーゼ活性／ウミシイタケルシフェラーゼ活性として、その値からホタルルシフェラーゼの翻訳効率を解析した。

3-2-11. 統計処理

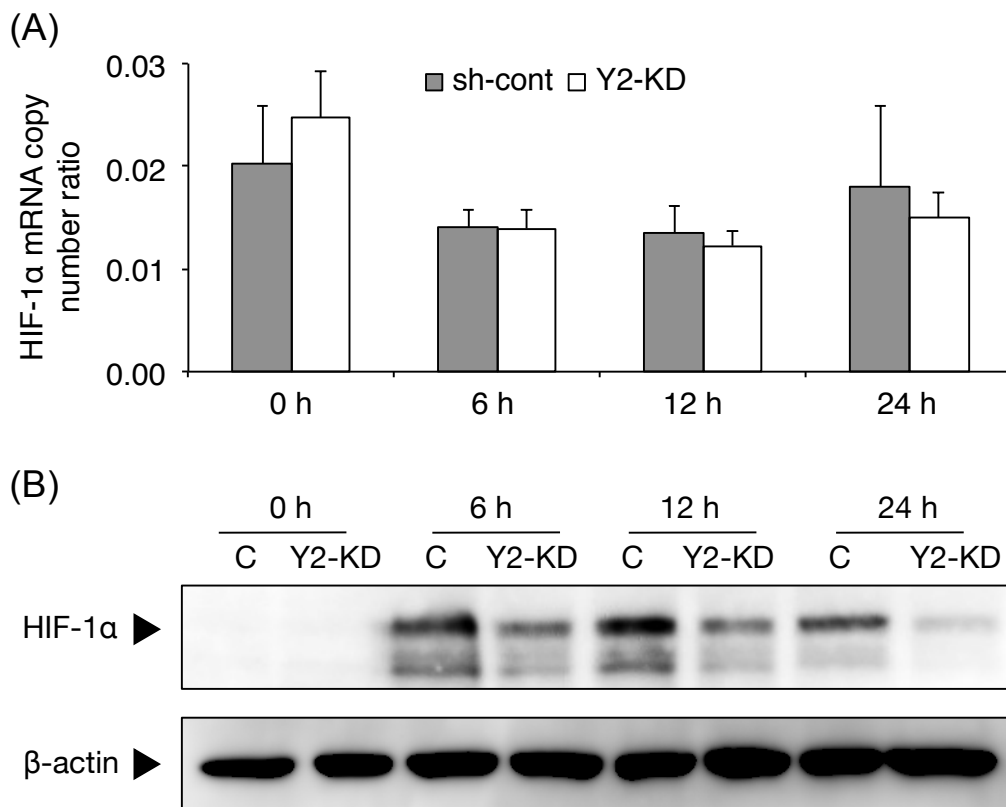
すべての結果は、平均値±標準偏差(SD)で示した。2 群間の平均値の比較は、

Student's t 検定により評価した。P 値が 0.05 または 0.01 以下の場合、有意な差があると判断した。

3-3. 結果

3-3-1. YTHDC2 は HIF-1 α の翻訳を促進する

YTHDC2 が低酸素環境において癌細胞の転移を促進する Twist1 の翻訳開始に関与することが谷川らによって明らかにされた(谷川賢弥、2014、修士論文)。そこで筆者は、低酸素における YTHDC2 の役割を解析するため、擬似的な低酸素環境を低酸素インキュベーターで作製し、その中で sh-cont 細胞と Y2-KD 細胞を培養した。まず、細胞が低酸素に曝されていることを確認するため、低酸素マーカーである低酸素誘導因子 1 α (Hypoxia Inducible Factor-1 α : HIF-1 α)の発現量を調べた。HIF-1 α は正常酸素環境(酸素濃度 20%前後)では、ユビキチン-プロテアソーム経路を介してタンパク質分解されるため、タンパク質の発現量が減少しているが、低酸素環境(酸素濃度 1%前後)では、ユビキチン化が阻害されるため、タンパク質の発現量が増加する^(13, 14)。酸素濃度 1%の低酸素環境で培養した sh-cont 細胞および Y2-KD 細胞の HIF-1 α の mRNA 発現量を定量的 real-time PCR で測定した結果、mRNA 発現量には有意な変化が見られず、sh-cont 細胞と Y2-KD 細胞の間にも有意な差がなかった(図表 3-1A)。その一方で、ウェスタンブロットによりタンパク質発現量を調べた結果、低酸素環境における HIF-1 α のタンパク質発現量は sh-cont 細胞では大きく増加しているが、Y2-KD 細胞ではあまり増加していないことが示された(図表 3-1B)。これらの結果から、低酸素環境において YTHDC2 は HIF-1 α の翻訳を促進していることが示唆された。HIF-1 α は低酸素に対する細胞応答の中心的な役割を担う転写因子であり、細胞の生存や血管新生、転移に関与する遺伝子の発現を制御している^(13, 14)。筆者は低酸素環境において YTHDC2 が HIF-1 α の翻訳を促進することが大腸癌細胞の転移に重要な役割を果たしていると考え、HIF-1 α の翻訳メカニズムについてさらに解析を行った。

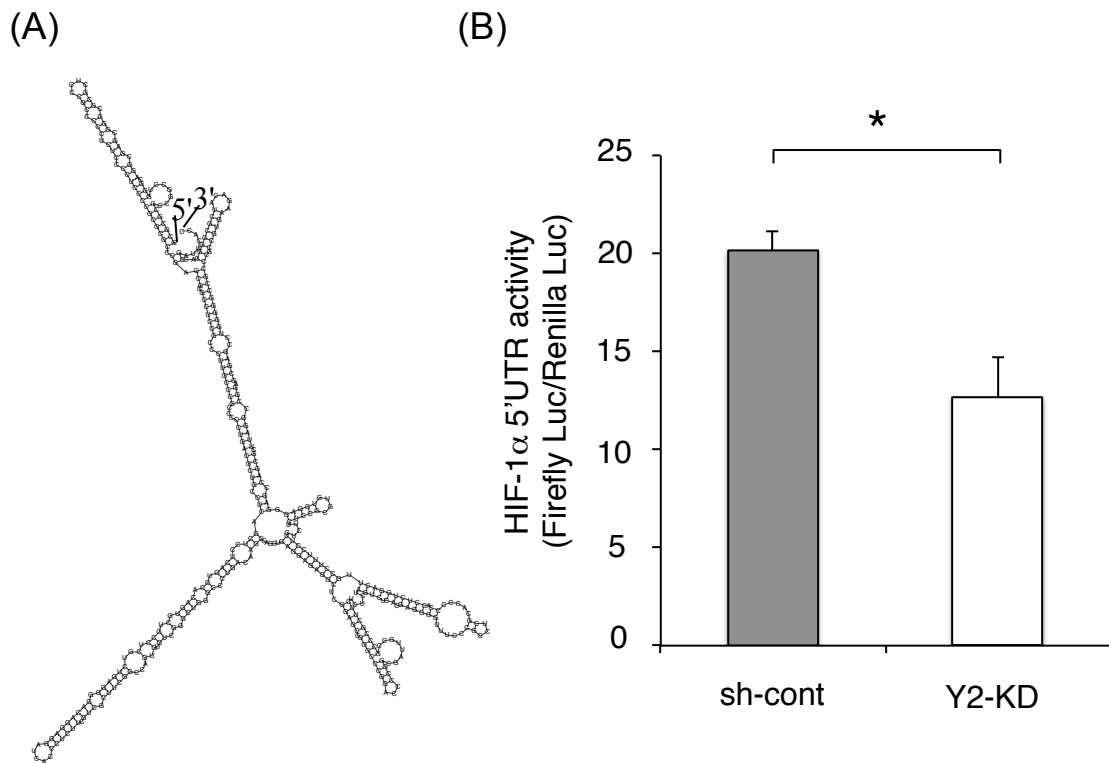


図表 3-1. YTHDC2 は HIF-1 α の翻訳を促進する

sh-cont 細胞と Y2-KD 細胞を低酸素環境(酸素濃度 1%)で 0、6、12、24 時間、培養した。(A) sh-cont 細胞と Y2-KD 細胞における *HIF-1 α* mRNA の発現量の解析。
(B) sh-cont 細胞(C)と Y2-KD 細胞における HIF-1 α タンパク質の発現量の解析。

3-3-2. YTHDC2 は 5'UTR の二次構造を解くことで HIF-1 α の翻訳を促進する

HIF-1 α の 5'UTR の配列情報を UTRdb データベースから取得し、RNAfold webserver により解析した結果、図表 3-1A に示す二次構造を形成することと塩基対間の結合度の指標である最小自由化エネルギーが -184.01 kcal/mol であることがわかった。無作為に選んだ 300 種類の遺伝子の 5'UTR についても同じ作業を行い、最小自由化エネルギーを計算した結果、その平均値は -101.63 kcal/mol であった。最小自由化エネルギーは低い値ほど構造の安定性を意味しているので、*HIF-1 α* の 5'UTR は平均的な 5'UTR よりも複雑な二次構造を取りやすいことが示唆された。次に、YTHDC2 が *HIF-1 α* の 5'UTR の二次構造を解消することで翻訳を促進するか否かを解析した。そのために、ルシフェラーゼレポーターアッセイを応用して次の実験を行った。ホタルルシフェラーゼ発現ベクター；pGL3-control vector の SV40 プロモーター領域とホタルルシフェラーゼ遺伝子領域の間に *HIF-1 α* mRNA の 5'UTR を挿入した。このベクターからホタルルシフェラーゼ遺伝子の mRNA が転写されると、開始コドンの前に *HIF-1 α* mRNA の 5'UTR と同じ二次構造が形成される。したがって、YTHDC2 が 5'UTR の二次構造を解くことで翻訳を促進するならば、Y2-KD 細胞ではこの二次構造が解けないので、sh-cont 細胞と比べてホタルルシフェラーゼ活性が低下すると予想される。ルシフェラーゼレポーターアッセイの結果、Y2-KD 細胞では sh-cont 細胞と比べてホタルルシフェラーゼの活性が約 30%減少した(図表 3-2B)。この結果から HIF-1 α の翻訳には YTHDC2 が必要とされていることが示唆された。



図表 3-2. *HIF-1α* 5'UTR のルシフェラーゼレポーターアッセイ

(A) RNAfold webserver により解析した *HIF-1α* 5'UTR の二次構造の模式図。 (B) グラフの縦軸は *HIF-1α* 5'UTR を挿入したホタルルシフェラーゼの活性をインターナルコントロールであるウミシイタケルシフェラーゼの活性で標準化した値を示している。(* $P < 0.05$ vs. sh-cont)

3-5. 考察

第3章では、低酸素環境における YTHDC2 の役割について解析をした。その結果、HIF-1 α が低酸素環境における YTHDC2 の標的遺伝子であることが示唆された。

HIF-1 α は低酸素に対する細胞応答の中心的な役割を担う転写因子であり、HIF-1 β とヘテロダイマーを形成することで様々な遺伝子の発現を調節する^(13, 14)。とくに癌において HIF-1 α は、*Glut1*⁽³⁰⁾、*VEGF*⁽³¹⁾、*Twist1*⁽³²⁾などの遺伝子発現を調節することで癌細胞の増殖、癌組織への血管新生、癌細胞の遠隔転移に寄与している。正常な酸素環境では、HIF-1 α のタンパク発現は低く制御されているが、これはタンパク質の翻訳量が少ないためではなく、von Hippel-Lindau タンパク質(VHL)が仲介するユビキチン-プロテアソーム経路で分解されているからである。HIF-1 α タンパク質には oxygen-dependent degradation(ODD)ドメインと呼ばれる領域があり、その領域に含まれる 2 つのプロリン残基がプロリン水酸化酵素(PHD)によって水酸化される。この水酸化されたプロリン残基を標的に VHL などのユビキチンリガーゼが HIF-1 α タンパク質をユビキチン化し、プロテアソームで分解させる。一方、低酸素環境では PHD の活性は低下するので HIF-1 α タンパク質は安定化し、標的遺伝子の転写を促進する^(13, 14)。本研究でも、細胞を低酸素環境で培養することで HIF-1 α タンパク質の発現量が増加することを確認できたが、Y2-KD 細胞における HIF-1 α タンパク質の発現量はコントロールに比べると少なかった(図表 3-2B)。一方で mRNA の転写量には差がなかったことから、Y2-KD 細胞では HIF-1 α タンパク質の翻訳が阻害されていることが示唆された。

HIF-1 α タンパク質の発現制御には、ユビキチン-プロテアソーム経路とは別に、翻訳依存的な制御機構も存在する。近年の研究から、効率的な HIF-1 α の翻訳に

は *HIF-1 α* mRNA の 5'UTR とそこに結合する複数の RNA 結合タンパク質が必要であることが示唆されている⁽³³⁻³⁵⁾。*HIF-1 α* 含む多くの mRNA が 5'UTR に複雑な二次構造を持っているが、これらの二次構造は通常、RNA ヘリカーゼ eIF4A によって解かれる^(7, 36)。しかし、いくつかの mRNA の 5'UTR を解くために、別の RNA ヘリカーゼが必要とされる場合がある。例えば、*Cyclin E1* や *Rac1* mRNA の 5'UTR を解くために RNA ヘリカーゼ DDX3 が必要とされることが報告されている^(10, 15)。谷川は Y2-KD 細胞において様々な mRNA の翻訳が開始段階で抑制されていることを発見している(谷川賢弥、2014、修士論文)。これらの知見から、筆者は YTHDC2 が *HIF-1 α* mRNA の 5'UTR の二次構造を解くことで翻訳の開始を促進していると考えた。そこで、*HIF-1 α* mRNA の 5'UTR を挿入したホタルルシフェラーゼ mRNA を擬似的な *HIF-1 α* mRNA に見立て、そのルシフェラーゼの翻訳効率を解析した。本実験と同様にルシフェラーゼレポーターアッセイを応用した手法は、様々な遺伝子の翻訳効率の解析に使用されている^(9, 15, 35)。実験の結果、Y2-KD 細胞における *HIF-1 α* mRNA の 5'UTR を挿入したホタルルシフェラーゼの翻訳効率はコントロールに比べて有意に低下していたため、YTHDC2 が *HIF-1 α* mRNA の 5'UTR の二次構造を解くことで翻訳の開始を促進していることが強く示唆された(図表 3-2B)。

総括

YTHDC2 は種々の癌細胞で発現が高く、正常な細胞や組織では発現が低く制御されている遺伝子である。しかし、YTHDC2 の詳細な発現制御の仕組みや癌細胞における役割についてはまだほとんど明らかにされていない。そこで本研究は、YTHDC2 の転写制御機構と大腸癌細胞の転移能力における役割について解明することを目的とした。まず第 1 章では、YTHDC2 遺伝子のプロモーター領域内の CRE サイトと転写因子 c-Jun と ATF-2 の活性が YTHDC2 の転写制御に重要であることがわかった。続く第 2 章では、*in vitro* と *in vivo* における研究により YTHDC2 が大腸癌細胞の転移能力に寄与していることが示唆され、さらに、実際のヒト大腸癌の進行度と YTHDC2 の発現に正の相関が認められた。これらの結果から、臨床的にも YTHDC2 が転移を伴う大腸癌の進行に重要な役割を持つことが示唆された。腫瘍の内部は慢性的に低酸素状態であり、癌細胞がその状態に適応またはそこから逃避するために転移能力を亢進することが知られている。そこで第 3 章では、低酸素環境における YTHDC2 の役割を解析した。その結果、YTHDC2 は低酸素応答において中心的な役割を担う HIF-1 α タンパク質の翻訳を促進することで、大腸癌細胞の転移を促進していることが示唆された。今後さらに YTHDC2 の発現制御の仕組みや癌転移における役割を解析することで、YTHDC2 が癌治療における予後予測因子または治療標的遺伝子として利用したいと考えている。

本論文の一部は以下に公表した。

A. Tanabe, J. Konno, K. Tanikawa, H. Sahara, Transcriptional machinery of TNF- α -inducible YTH domain containing 2 (YTHDC2) gene, *Gene* 535 (2014) 24–32.
doi: 10.1016/j.gene.2013.11.005.

A. Tanabe, K. Tanikawa, M. Tsunetomi, K. Takai, H. Ikeda, J. Konno, T. Torigoe, H. Maeda, G. Kutomi, K. Okita, M. Mori, H. Sahara, RNA helicase YTHDC2 promotes cancer metastasis via the enhancement of the efficiency by which *HIF-1 α* mRNA is translated, *Cancer letters*, doi: 10.1016/j.canlet.2016.02.022.

引用文献

- [1] P. Stoilov, I. Rafalska, S. Stamm, YTH: a new domain in nuclear proteins, *Trends Biochem. Sci.* 27 (2002) 495–497.
- [2] Z. Zhang, D. Theler, K.H. Kaminska, M. Hiller, P. de la Grange, Pudimat R, et al., The YTH domain is a novel RNA binding domain, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 14701–14710.
- [3] J.M. Caruthers, D.B. McKay, Helicase structure and mechanism, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12 (2002) 123–133.
- [4] O. Cordin, J. Banroques, N.K. Tanner, P. Linder, The DEAD-box protein family of RNA helicases, *Gene* 367 (2006) 17–37.
- [5] N.K. Tanner, P. Linder, DExD/H box RNA helicases: from generic motors to specific dissociation functions, *Mol. Cell* 8 (2001) 251–262.
- [6] F.V. Fuller-Pace, DExD/H box RNA helicases: multifunctional proteins with important roles in transcriptional regulation, *Nucleic Acids Res.* 34 (2006) 4206–4215.
- [7] A. Marintchev, Roles of helicases in translation initiation: A mechanistic view, *Biochim. Biophys. Acta.* 1829 (2013) 799–809.
- [8] A. Parsyan, D. Shahbazian, Y. Martineau, E. Petroulakis, T. Alain, O. Larsson, et al., The helicase protein DHX29 promotes translation initiation, cell proliferation, and tumorigenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106 (2009) 22217–22222.
- [9] M.C. Lai, W.C. Chang, S.Y. Shieh, W.Y. Tarn, DDX3 regulates cell growth through translational control of cyclin E1, *Mol. Cell Biol.* 30 (2010) 5444–5453.
- [10] K. Morohashi, H. Sahara, K. Watashi, K. Iwabata, T. Sunoki, K. Kuramochi, K. Takakusagi, et al., Cyclosporin A associated helicase-like protein facilitates the

- association of hepatitis C virus RNA polymerase with its cellular cyclophilin B, PLoS One 6 (2011) e18285.
- [11] J.P. Thiery, H. Acloque, R.Y.J. Huang, M.A. Nieto, Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease, Cell 139 (2009) 871–890.
- [12] S. Valastyan, R.A. Weinberg, Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms, Cell 147 (2011) 275–292.
- [13] M.A. Maynard, M. Ohh, The role of hypoxia-inducible factors in cancer, Cell. Mol. Life Sci. 64 (2007) 2170–2180.
- [14] A.J. Majmudar, W.J. Wong, M.C. Simon, Hypoxia-Inducible Factors and the Response to Hypoxic Stress, Mol. Cell 40 (2010) 294–309.
- [15] H.H. Chen, H.I. Yu, W.C. Cho, W.Y. Tarn, DDX3 modulates cell adhesion and motility and cancer cell metastasis via Rac1-mediated signaling pathway, Oncogene 34 (2014) 2790–2800.
- [16] A. Colmone, S. Li, C.R. Wang, Activating transcription factor/cAMP response element binding protein family member regulated transcription of CD1A. J. Immunol. 177 (2006), 7024–7032.
- [17] B. Samten, J.C. Townsend, S.E. Weis, A. Bhoumi, P. Klucar, H. Shams, P.F. Barnes, CREB, ATF, and AP-1 transcription factors regulate IFN-gamma secretion by human T cells in response to mycobacterial antigen. J. Immunol. 181 (2008), 2056–2064.

- [18] B.E. Lonze, D.D. Ginty, Function and Regulation of CREB Family Transcription Factors in the Nervous System CREB and its close relatives are now widely accepted. *Neuron* 35 (2002), 605–623.
- [19] A.Y. Wen, K.M. Sakamoto, L.S. Miller, The role of the transcription factor CREB in immune function. *J. Immunol.* 185 (2010), 6413–6419.
- [20] H. van Dam, M. Castellazzi, Distinct roles of Jun : Fos and Jun : ATF dimers in oncogenesis. *Oncogene* 20 (2001), 2453–2464.
- [21] A. Bhoumik, ATF2: A transcription factor that elicits oncogenic or tumor suppressor activities. *Cell cycle* 7 (2008), 2341–2345.
- [22] H. Walczak, TNF and ubiquitin at the crossroads of gene activation, cell death, inflammation, and cancer. *Immunol. Rev.* 244 (2011), 9–28.
- [23] M.S. Hayden, S. Ghosh, Shared principles in NF- κ B signaling. *Cell* 132 (2008), 344–362.
- [24] E.E. Varfolomeev, A. Ashkenazi, Tumor necrosis factor: an apoptosis JuNKie? *Cell* 116 (2004), 491–497.
- [25] E. Larrea, N. Garcia, C. Qian, M.P. Civera, J. Prieto, Tumor necrosis factor a gene expression and the response to interferon in chronic hepatitis C. *Hepatology* 23 (1996), 210–217.

- [26] A. Dolganinuc, O. Norkina, K. Kodys, D. Catalano, G. Bakis, C. Marshall, et al.,
Viral and host factor macrophage activation and loss of Toll Like Receptor
tolerance in chronic HCV infection. *Gastroenterology* 133 (2007), 1627-1636.
- [27] A. Tanabe, J. Konno, K. Tanikawa, H. Sahara, Transcriptional machinery of
TNF- α -inducible YTH domain containing 2 (YTHDC2) gene, *Gene* 535 (2014)
24–32.
- [28] K. Ishizu, N. Sunose, K. Yamazaki, T. Tsuruo, S. Sadahiro, H. Makuuchi, et al.,
Development and Characterization of a Model of Liver Metastasis Using Human
Colon Cancer HCT-116 Cells, *Biol. Pharm. Bull.* 30 (2007) 1779–83.
- [29] L. Gao, R. Mejias, M. Echevarria, J. Lopez-Barneo, Induction of the
glucose-6-phosphate dehydrogenase gene expression by chronic hypoxia in PC12
cells, *FEBS letters* 569 (2004) 256–260.
- [30] J. Chen, S. Zhao, K. Nakada, Y. Kuge, N. Tamaki, F. Okada, et al.,
Dominant-Negative Hypoxia-Inducible Factor-1 α Reduces Tumorigenicity of
Pancreatic Cancer Cells through the Suppression of Glucose Metabolism, *Am. J.*
Pathol. 162 (2003) 1283–91.
- [31] N. Tang, L. Wang, J. F. J. Giordano, Y. Huang, H. P. Gerber, N. Ferrara, et al.,
Cancer Cell. 6 (2004) 485–95.
- [32] M.H. Yang, M.Z. Wu, S.H. Chiou, P.M. Chen, S.Y. Chang, C.J. Liu, et al., Direct
regulation of TWIST by HIF-1 α promotes metastasis, *Nat. Cell Biol.* 10 (2008)
295–305.
- [33] K.J. Lang, A. Kappel, G.J. Goodall, Hypoxia-inducible factor-1 mRNA contains
an internal ribosome entry site that allows efficient translation during normoxia

- and hypoxia, *Mol. Biol. Cell* 13 (2002) 1792–1801.
- [34] M. Yasuda, T. Hatanaka, H. Shirato, T. Nishioka, Cell type-specific reciprocal regulation of HIF1A gene expression is dependent on 5'- and 3'-UTRs, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 447 (2014) 638–643.
- [35] A.M. El-Naggar, C.J. Veinotte, H. Cheng, T.G.P. Grunewald, G.L. Negri, S.P. Somasekharn, Translational activation of HIF1 α by YB-1 promotes sarcoma metastasis, *Cancer Cell* 27 (2015) 682–697.
- [36] Y.V. Svitkin, A. Pause, A. Haghighat, S. Pyronnet, G. Witherell, G.J. Belsham, et al., The requirement for eukaryotic initiation factor 4A (eIF4A) in translation is in direct proportion to the degree of mRNA 5' secondary structure, *RNA* 7 (2001) 382–394.

謝辞

本研究の遂行ならびに論文の作成にあたり、ご指導、ご鞭撻を賜りました本学獣医学部基礎教育研究室・生物学教授 佐原弘益博士に深く感謝致します。

ご多忙の中、副査をお引き受けいただいた、本学獣医学部本学獣医学部分子生物学研究室教授 村上賢博士、動物工学研究室教授 滝沢達也博士、病理学研究室教授 代田欣二博士に厚く御礼申し上げます。とくに、村上賢博士には塩基配列解析において御尽力を賜りましたことを厚く御礼申し上げます。

また、札幌医科大学医学部病理学第一講座教授 鳥越俊彦博士ならびに消化器・総合、乳腺・内分泌外科学講座講師 九富五郎先生、助教・前田豪樹先生、助教・沖田憲司先生にはヒト大腸癌の外科病理学的解析において御尽力を賜りましたことを厚く御礼申し上げます。